

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Interacción entre el sistema endocrino y los osciladores circadianos en el carpín (*Carssius auratus*): regulación de genes reloj en relojes centrales y periféricos por péptidos de origen gastrointestinal y por glucocorticoides**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Aida Sánchez-Breña Sánchez**

Directores

**Esther Isorna Alonso**  
**Ángel Luis Alonso Gómez**

**Madrid, 2017**

# **TESIS DOCTORAL**

## **INTERACCIÓN ENTRE EL SISTEMA ENDOCRINO Y LOS OSCILADORES CIRCADIANOS EN EL CARPÍN (*Carassius auratus*): REGULACIÓN DE GENES RELOJ EN RELOJES CENTRALES Y PERIFÉRICOS POR PÉPTIDOS DE ORIGEN GASTROINTESTINAL Y POR GLUCOCORTICOIDES.**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

MEMORIA PRESENTADA POR AIDA SÁNCHEZ-BRETAÑO SÁNCHEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA POR LA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

MADRID, 2016





# PhD THESIS

## **INTERACTION BETWEEN ENDOCRINE SYSTEM AND CIRCADIAN OSCILLATORS OF GOLDFISH (*Carassius auratus*): REGULATION OF CLOCK GENES IN CENTRAL AND PERIPHERAL CLOCKS BY GASTROINTESTINAL PEPTIDES AND GLUCOCORTICOIDS.**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

THESIS PRESENTED BY AIDA SÁNCHEZ-BRETAÑO SÁNCHEZ  
TO OBTAIN THE DOCTORATE DEGREE BY COMPLUTENSE

UNIVERSITY OF MADRID

MADRID, 2016



Esther Isorna Alonso, Profesora Contratada Doctor de la Universidad Complutense de Madrid  
y Ángel Luis Alonso-Gómez, Profesor Titular de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada **“interacción entre el sistema endocrino y los osciladores circadianos en el carpín (*Carassius auratus*): regulación de genes reloj en relojes centrales y periféricos por péptidos de origen gastrointestinal y por glucocorticoides”** presentada por Aída Sánchez-Bretaña Sánchez, licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos para ser evaluada.

Y para que conste y a efectos oportunos, firman el presente a 11 de enero de 2015.

Dra. Esther Isorna Alonso

Dr. Ángel Luis Alonso Gómez

Candidata: Aída Sánchez-Bretaña Sánchez



La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la codirección de la Dra. Esther Isorna Alonso y el Dr. Ángel Luis Alonso Gómez.

Este trabajo se realizó con la ayuda económica del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (AGL2010-22247-C03-02 y GL2013-46448-C3-2-R). Aída Sánchez-Breña Sánchez fue dotada con una Beca predoctoral del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (BES-2011-047620).





“Everything is determined, the beginning as well as the end, by forces over which we have no control. It is determined for the insect, as well as for the star. Human beings, vegetables, or cosmic dust, we all dance to a mysterious tune, intoned in the distance by an invisible piper.”

Albert Einstein

*A mi padre*

*A mi pequeña gran familia*





*Esta tesis está formada por pequeños trocitos de todas esas  
personas que me han cuidado a lo largo de todo el viaje.*

*Gracias, os quiero.*



## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>15</b>
<b>RESUMEN/SUMMARY.....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>39</b>
1. Ritmos biológicos y sistema circadiano.....	41
1.1. Base molecular de los relojes endógenos	
1.2. Organización funcional del sistema circadiano	
2. Señales sincronizadoras.....	49
2.1. Señales ambientales externas	
2.2. Señales internas	
2.2.1. Ghrelina	
2.2.2. Glucocorticoides	
3. El carpín dorado: características de la especie.....	74
<b>OBJETIVOS/OBJECTIVES.....</b>	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>89</b>
Resumen.....	91
1.1. Distribución anatómica y perfil diario de expresión del gen <i>gper1b</i> en cerebro y estructuras periféricas del carpín. ....	95
Diseños experimentales.....	95
Anatomical distribution and daily profile of <i>gper1b</i> gene expression in brain and peripheral structures of goldfish ( <i>Carassius auratus</i> ). Chronobiology International. (2015) 32(7): 889-902....	97
1.2. Distribución anatómica y perfil diario de expresión de ghrelina y el receptor de ghrelina GHS-R1 en cerebro y tracto gastrointestinal del carpín. ....	117
Diseños experimentales.....	117
Anatomical distribution and daily expression of ghrelin and <i>ghs-r1</i> ghrelin receptor in brain and gastrointestinal tract of goldfish ( <i>Carassius auratus</i> ). PLOS One. (2015) 10(10):e0141043.....	119

<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>141</b>
Resumen.....	143
2.1. La ghrelina como reguladora de genes reloj en el hígado cultivado del carpín....	147
Diseños experimentales.....	147
Role of ghrelin as modulator of clock genes expression in the liver of goldfish ( <i>Carassius auratus</i> ) <i>in vitro</i> : actions via PLC-PKC and AC-PKA pathways. Enviado a Journal of Experimental Biology.....	153
2.2. Glucocorticoides como reguladores de genes reloj en el hígado cultivado del carpín.....	169
Diseños experimentales. (Parte A) .....	169
Performing a hepatic timing signal: glucocorticoids induce <i>gper1a</i> and <i>gper1b</i> expression and repress <i>gclock1a</i> and <i>gbmal1a</i> in the liver of goldfish. Journal of Comparative Physiology. Part B. (2016) 186(1): 73-82.....	173
Diseños experimentales. (Parte B) .....	187
Clock genes expression in liver of goldfish <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> and synchronization by glucocorticoids. Journal of Comparative Physiology. Part B. En preparación.....	191
2.3. El oscilador hepático en carpín dorado. Modificaciones por el ciclo luz oscuridad, el horario de alimentación y hormonas.....	205
Diseños experimentales.....	205
The liver as a component of the circadian system: integrating a network of signals. General and Comparative Endocrinology (2015) 221: 213–216.....	207
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>211</b>
1. Anatomía del sistema circadiano del carpín .....	213
2. El sistema circadiano del carpín como una red de osciladores en fase.....	224
3. El hígado del carpín como oscilador. ....	235
4. Diferente sensibilidad de los genes reloj en el sistema circadiano del carpín. Los genes <i>per</i> como entrada de señales hormonales al sistema circadiano.....	245
5. Consideraciones finales.....	247
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....</b>	<b>249</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>261</b>

## ABREVIATURAS

AANAT	N-acetiltransferasa
AC	Adenilato ciclasa
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AgRP	Agouti-Related Protein
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	proteína quinasa activada por AMP
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajeros
bHLH	<i>basic-Helix-Loop-Helix</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
CCGs	Genes controlados por el reloj
CHEL	Chelerritrina
clock	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
cry	Genes <i>cryptochrome</i>
CT	<i>Circadian time</i>
DEPC	Dietil-piromcarbonato
DEX	Dexametasona
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
FAA	<i>Food anticipatory activity</i>
FEO	<i>Food Entrainable Oscillator</i>
GH	Hormona del crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
GHS-R	<i>Growth hormone secretagogue receptor</i>
GR	Receptores de glucocorticoides
GRL	Ghrelin
HSP	Proteínas de shock térmico
IP	Intraperitoneal
ipRGCs	células ganglionares intrínsecamente fotosensibles de la retina
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LEO	<i>Lighe Entrainable Oscillator</i>
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MC2R	receptores de melanocortina tipo 2
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfónico
MR	Receptores de mineralocorticoides
MT 1 y 2	<i>Receptores de melatonina</i>
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPY	Neuropéptido Y
PAS	<i>Period-Arnt-Single-minded</i>

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
per	Genes <i>period</i>
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
RFU	<i>Relative fluorescence units</i>
VIP	Péptido vasoactivo intestinal
ZT	<i>Zeitgeber time</i>

## RESUMEN







## Introducción

En la actualidad se considera el sistema circadiano de vertebrados como una red de osciladores que trabajan coordinadamente (Albrecht, 2012). Con respecto al carpín (*Carassius auratus*), especie de teleosteo objeto de la presente Tesis Doctoral, la localización de los osciladores endógenos que constituyen su sistema circadiano ha sido estudiada ampliamente por nuestro grupo de investigación mediante técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real, demostrándose la expresión rítmica de genes reloj, componentes moleculares de los osciladores, en localizaciones encefálicas y periféricas (Feliciano et al., 2011; Nisembaum et al., 2012; Velarde et al., 2009). Sin embargo, hasta la fecha, no existe información sobre la localización anatómica de dichos osciladores en el carpín y apenas existen algunos estudios que lo muestren en otras especies teleosteas, estando todos ellos limitados al cerebro (pez cebra, Cermakian et al., 2000, Moore y Withmore, 2014, Weger et al., 2013, Ziv et al., 2005; trucha arcoíris, Mazurais et al., 2000; y *Paralichthys olivaceus*, Watanabe et al., 2012), sin abordar en ningún caso el estudio de la localización celular de los genes reloj en localizaciones periféricas.

La comunicación entre osciladores es uno de los temas que suscita más interés en cronobiología en la actualidad y en este sentido, en los últimos años se ha descrito al hígado como uno de los osciladores endógenos más sensibles a diferentes señales rítmicas sistémicas y externas en mamíferos (Albrecht, 2012). Debido a que este órgano es uno de los principales responsables del metabolismo energético y reservas metabólicas (Schmutz et al., 2012), actualmente se está estudiando su papel en el contexto de la comunicación entre dicho metabolismo y el sistema circadiano. Además de las vías que transmiten la información lumínica a los osciladores periféricos como las de tipo nervioso, se ha propuesto que diversas señales hormonales serían responsables del mantenimiento y el correcto funcionamiento de los ritmos de los genes reloj en dichos osciladores, con especial relevancia en el hígado. Así, en mamíferos se ha demostrado que los componentes moleculares del oscilador hepático están regulados por determinadas señales hormonales como el glucagón (Sun et al., 2015) y los glucocorticoides (Balsalobre et al., 2000a; Fukuoka et al., 2005; Oishi et al., 2005; Reddy et al., 2007; Schmutz et al., 2012; Sujino et al., 2012; Yamamoto et al., 2005). En el caso del carpín, estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado la presencia en el hígado de la maquinaria molecular típica de los osciladores endógenos, los genes reloj, así como su regulación tanto por el ciclo luz/oscuridad como por el horario de alimentación (Feliciano et al., 2011; Tinoco et al., 2014; Velarde et al., 2009).

La presente Tesis Doctoral tiene por **objetivo general** estudiar las vías de comunicación entre los diferentes osciladores endógenos del carpín. Para ello, en primer lugar se analizó la distribución anatómica de los osciladores endógenos del carpín en localizaciones centrales y periféricas y se estudió su funcionalidad, entendida como la existencia de ritmicidad diaria de la expresión de genes reloj en estas áreas. A continuación se analizaron dos señales hormonales susceptibles de ser consideradas vías de entrada al sistema circadiano: el sistema ghrelinérgico, del cual se analizó tanto su localización anatómica como el patrón de expresión diario y los glucocorticoides, concretamente el cortisol, del cual se estudió también su patrón diario de concentración en plasma. Finalmente, se utilizó el hígado como un oscilador modelo para estudiar el efecto de diferentes señalizaciones circadianas procedentes de diferentes localizaciones del organismo. Para ello, se seleccionaron la ghrelina, cuyo principal lugar de síntesis endógeno es el tracto gastrointestinal y el cortisol sintetizado a nivel interrenal. Así, se analizó el impacto de ambas hormonas de diferentes procedencias en el organismo sobre la funcionalidad del oscilador hepático entendida como la expresión de genes reloj en esta localización.

## Contenido de la investigación

### 1. Distribución anatómica de los osciladores circadianos del carpín.

Con el fin de investigar la localización anatómica en áreas encefálicas y periféricas del carpín dorado se clonó parcialmente la secuencia del gen reloj *gper1b* (gen reloj no estudiado previamente en esta especie) y a continuación, se realizaron estudios de hibridación *in situ* de carpines mantenidos en condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (12L:12D, considerando el encendido de las luces el *zeitgeber time* (ZT) = 0) y horario de alimentación fijado dos horas después del encendido de las luces (ZT 2). En estas condiciones se tomaron muestras al final del periodo de luz y al final del periodo de oscuridad de tejido encefálico, hipófisis, hígado e intestino anterior y se estudió la expresión de *gper1b* mediante hibridación *in situ*. Los resultados obtenidos muestran la presencia del ARNm del gen reloj en todos los tejidos analizados (encéfalo, hipófisis, intestino anterior e hígado). Concretamente, la distribución observada en el encéfalo coincide con la previamente descrita para el pez cebra (Weger et al., 2013). Muchos de los núcleos que presentan expresión de *gper1b* han sido previamente relacionados en teleósteos con la captación de luz del ambiente mediante conexiones con la retina (Folgueira et al., 2007; Moore y Whitmore, 2014; Muñoz-Cueto et al., 1998) o la glándula pineal (Falcón, 1999; Yáñez et al., 2009), así como con sistemas de regulación de la ingesta como el orexinérgico (Facciolo et al., 2010; Facciolo et al., 2012) o el NPYérgico (Hoskins y Volkoff, 2012; Kah et al., 1989). En el caso de las localizaciones periféricas, en hipófisis e hígado la distribución de *gper1b* es amplia ya que se

expresa en casi la totalidad de las células, mientras que en el intestino anterior aparece en todas sus capas aunque en células aisladas (mucosa, submucosa y muscular).

Además, los resultados obtenidos demuestran la relevancia de dicho gen dentro del contexto de funcionalidad de los osciladores moleculares medida como su capacidad de expresarse siguiendo un patrón rítmico cercano a 24 h, con un desfase de aproximadamente 12 horas entre los genes del bucle positivo y los del bucle negativo del oscilador molecular. Esta ritmicidad se pone de manifiesto en el estudio de hibridación *in situ* como una diferencia en la intensidad de señal dependiendo de la hora de la toma de muestras que se confirma con un estudio posterior en el que se recogen muestras de los mismos tejidos en carpines mantenidos en las mismas condiciones y se estudia la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Asimismo, se demuestra la coordinación entre los diferentes osciladores ya que presentan, en todos los tejidos estudiados, un ritmo en fase, con el máximo de expresión de *gper1b* durante la fase oscura del fotociclo, anticipando la llegada de la luz y el alimento. Por otro lado, cada uno de los genes reloj muestra diferente amplitud que los demás, lo que sugiere que cada oscilador del sistema circadiano presenta una sensibilidad diferente a las distintas señales que recibe.

## 2. Distribución anatómica del sistema ghrelinérgico.

Por otro lado, se ha analizado la distribución anatómica del sistema ghrelinérgico, puesto que recientemente se ha relacionado a la ghrelina con el sistema circadiano en el carpín (Nisembaum et al., 2014). Para ello se analizó la presencia de ghrelina y de su receptor de tipo 1a en animales mantenidos en condiciones de 12L:12D y alimentados a ZT 2 mediante hibridación *in situ*. En este sentido, los presentes resultados corroboran la conocida organización anatómica de la ghrelina en el tracto gastrointestinal de teleósteos (Arcamone et al., 2009; Olsson et al., 2008; Sakata et al., 2004). Asimismo, en la presente Tesis se presenta por primera vez en teleósteos la distribución anatómica del ARNm del receptor GHS-R1a. Concretamente, se demuestra su presencia en todas las capas de las diferentes regiones del intestino proximal (esófago, bulbo intestinal, bucle en “J” e intestino anterior) y en cerebro. Destaca su presencia tanto en hipotálamo como en otras localizaciones que coinciden con áreas donde previamente se han encontrado en teleósteos otros sistemas relacionados con la ingesta como el orexinérgico (Facciolo et al., 2010; Facciolo et al., 2012) y el NPYérgico (Hoskins y Volkoff, 2012; Kah et al., 1989), siendo éste último el más relacionado con la acción central de la ghrelina en la regulación de la ingesta. Además, se sugiere una posible co-expresión en las mismas áreas periféricas y encefálicas entre la ghrelina, su receptor y el

sistema circadiano, localizándose ambos en áreas similares, respaldando la hipótesis de que esta hormona puede actuar como señal de entrada al sistema circadiano del carpín.

### 3. Ritmicidad diaria de dos posibles señales sincronizadoras: ghrelina y glucocorticoides.

En general, para que una señal sea considerada una buena candidata para ser vía de entrada de información al sistema circadiano o sincronizadora suele ser necesario que presente un perfil rítmico diario. Si bien tanto la ghrelina como los glucocorticoides se han propuesto como posibles señales moduladoras de los osciladores endógenos en mamíferos (Balsalobre et al., 2000; LeSauter et al., 2009; Yamamoto et al., 2005; Yannielli et al., 2007), no se tiene información sobre la existencia de ritmos diarios de ghrelina en peces y hay muy pocos trabajos que estudien ritmos de glucocorticoides.

En este sentido, se estudió como parte de la presente Tesis Doctoral el patrón de expresión diario de los genes de la *preproghrelina* y su receptor *ghs-r1* en hipotálamo, hipófisis y tracto gastrointestinal, así como los niveles plasmáticos de cortisol, principal glucocorticoide en teleósteos. En todos los casos los carpines se mantuvieron en las mismas condiciones de aclimatación previamente descritas (12L:12D comiendo diariamente a ZT 2).

Los resultados obtenidos describen por primera vez en teleósteos la presencia de un patrón de expresión rítmico diario en los ARNm de la ghrelina y su receptor *ghs-r1* en hipotálamo y tracto gastrointestinal, con sus acrofases en fase con los genes pertenecientes al bucle negativo de retroalimentación (genes de las familias *per* y *cry*) en carpines mantenidos en las mismas condiciones apoyando la teoría de que esta hormona sea una salida del sistema circadiano en teleósteos. Por su parte, los niveles plasmáticos de cortisol muestran el mismo perfil con la máxima concentración durante la fase oscura, anticipando el periodo de actividad lo que coincide con lo previamente descrito en otros teleósteos (López-Olmeda et al., 2013; Pickering and Pottinger, 1983; Polakof et al., 2007) y mamíferos (Kalsbeek and Fliers, 2013).

### 4. Funcionamiento del oscilador hepático.

Con el fin de profundizar en el funcionamiento del oscilador hepático del carpín dorado, se analiza el perfil diario de expresión de los genes reloj en animales mantenidos en condiciones de 12L:12D y alimentados a ZT 2. Los resultados muestran un oscilador molecular funcional en el hígado del carpín en las condiciones experimentales analizadas, es decir, en presencia de los sincronizadores ambientales más importantes (ciclo luz-oscuridad y horario de alimentación). Por otra parte, resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación

muestran el mantenimiento de dichos ritmos diarios de expresión de los genes reloj en ausencia de solamente uno de los principales sincronizadores externos, si bien la amplitud de dichos ritmos se ve ligeramente amortiguada, resultados que se muestran en el presente manuscrito en el capítulo del hígado como oscilador en el carpín y que ponen de manifiesto el papel fundamental de ambos sincronizadores para el funcionamiento óptimo de este oscilador endógeno.

Finalmente, el aislamiento del hígado de cualquier señal sistémica mediante su extracción para su cultivo provoca una desaparición de los ritmos de casi todos los genes reloj analizados, salvo en el caso del gen *gper1b* que muestra una amplitud muy disminuida, lo que sugiere la necesidad de la presencia de señales fisiológicas que se pierden en el sistema *in vitro* y que serían responsables de la coordinación entre las diferentes células hepáticas así como reguladoras de la amplitud de estos genes reloj.

#### 5. Efecto de ghrelina y glucocorticoides sobre el oscilador hepático *in vitro* e *in vivo*.

Una vez demostrada la ritmicidad diaria de las dos hormonas estudiadas, ghrelina y glucocorticoides, se abordó el estudio de su posible acción como moduladoras del oscilador hepático del carpín en un modelo de cultivo de hígado *in vitro*. Para ello, en todos los casos los animales se mantuvieron en condiciones de 12L:12D y se sacrificaron a ZT 2 para la extracción del hígado y el comienzo de los cultivos (luz constante y  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Se estudió en primer lugar el efecto del tratamiento con ghrelina sobre la expresión de genes reloj, caracterizando dicha respuesta con el uso de un antagonista de la hormona así como con fármacos específicos de diferentes vías de transducción intracelular previamente relacionadas con la acción de dicha hormona. Por otra parte, se llevan a cabo estudios para averiguar el efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de genes reloj en los cultivos de hígado, empleando cortisol o dexametasona y analizándose tanto su efecto a corto plazo (horas) como a más largo plazo (días).

Los resultados obtenidos en su conjunto permiten establecer tanto a la ghrelina como a los glucocorticoides como señales moduladoras del oscilador hepático de carpín dorado a través de la modificación de los niveles de expresión de los genes reloj. Concretamente, en la presente Tesis Doctoral se demuestra por primera vez la acción directa *in vitro* sobre el oscilador hepático por parte de la ghrelina si bien resultados previos del grupo (Nisembaum et al., 2014) habían mostrado la acción de la ghrelina como modulador de algunos genes reloj cuando se inyectaba en carpines. Por otro lado, la presencia de los receptores de tipo *ghs-r1a* en las células hepáticas del carpín, sugiere que la acción de la ghrelina podría estar mediada

por este subtipo de receptor. Asimismo, se presenta por primera vez en peces teleósteos la vía PLC-PKC como la principal ruta intracelular implicada en la transducción de la señal de la ghrelina para ejercer su efecto modulador de los genes reloj así como la implicación de la vía AC-PKA en la modulación de la expresión de *gbmal1a* y *grev-erba*.

Con respecto a los glucocorticoides, se demuestra por primera vez en peces teleósteos su efecto como modulador de genes reloj en el hígado tanto en condiciones *in vivo* mediante inyecciones IP en animales mantenidos en condiciones 12L:12D de aclimatación como en hígado cultivado, demostrando su acción directa sobre las células hepáticas. Más aún, los glucocorticoides son capaces de inducir una sincronización del oscilador hepático en explantes de hígado *in vitro*. Si bien los glucocorticoides parecen ejercer una acción sincronizadora a nivel del hígado del carpín en cultivo, no parece ser la única señal implicada en los ritmos observados *in vivo* ya que en ningún caso se consigue restablecer los valores de amplitud observados en el hígado *in vivo*, lo que sugiere que el establecimiento de los ritmos de genes reloj y su fortaleza, entendida como la amplitud, debe ser el resultado de un conjunto de diferentes señales rítmicas recibidas por el hígado en condiciones fisiológicas.

## Conclusiones

A partir de estos resultados se proponen las siguientes conclusiones:

1. El sistema circadiano está formado por una red de osciladores endógenos funcionales distribuidos por áreas centrales y periféricas, considerando osciladores aquellas localizaciones que presentan expresión del gen reloj *gper1b*. Todos estos osciladores son funcionales y se encuentran en fase en condiciones 12L:12D y alimentación fija en ZT 2, con la acrofase en el periodo nocturno anticipando la llegada del alimento y la luz, mostrando diferentes amplitudes que sugieren una sensibilidad distinta a las señales rítmicas del entorno.
2. Los genes *preproghrelina* y *ghs-r1a* se expresan en multitud de áreas donde se detectó presencia de *gper1b* tanto a nivel central como en el tracto gastrointestinal, apoyando su posible papel como señal reguladora del sistema circadiano.
3. En cerebro se encuentran transcritos de *gper1b* y del gen *ghs-r1a* en localizaciones relacionadas con áreas fotosensibles o con áreas donde se ha descrito la presencia de sistemas relacionados con la regulación de la ingesta y el balance energético, demostrando la conexión anatómica entre la homeostasis energética y el sistema circadiano.

4. Tanto la *preproghrelina* como su receptor *ghs-r1* muestran perfiles de expresión diarios con máximos en fase con *gper1b* en carpines mantenidos en condiciones de 12L:12D y alimentación fija en ZT 2, sugiriendo que este sistema es una salida del sistema circadiano del carpín.
5. Los niveles plasmáticos de cortisol en carpines mantenidos en condiciones de 12L:12D y alimentación fija en ZT 2 tienen perfil diario de concentración con su máximo en la escotofase, antes del inicio de la fase activa, apoyando un posible papel de esta hormona como “hormona del despertar”, al igual que se ha descrito para otros vertebrados.
6. El oscilador hepático del carpín es un oscilador funcional en fase con el resto de osciladores del organismo. En cultivo (es decir, cuando se encuentra aislado), los genes reloj del hígado pierden su ritmicidad diaria excepto el gen *gper1b* que presenta una amplitud claramente disminuida, lo que indica la necesidad de determinadas señales fisiológicas para el mantenimiento del funcionamiento del oscilador hepático del carpín.
7. El oscilador hepático del carpín, al igual que el de mamíferos, es sensible a multitud de señales endógenas entre las que se encuentran la ghrelina y los glucocorticoides, hormonas capaces de modular la expresión de genes reloj en el hígado de esta especie. Concretamente, ambas hormonas muestran efectos diferentes sobre la expresión de genes reloj.
8. En este sentido, la ghrelina induce la expresión de todos los genes analizados independientemente de si éstos son elementos negativos (genes *per*), positivos (*gbmal1a* y *gclock1a*) o del bucle auxiliar (*grev-erba*), a través de sus receptores y vía PLC-PKC y, parcialmente, vía AC-PKA (caso de *gbmal1a* y *grev-erba*).
9. Los glucocorticoides, por su parte, inducen la expresión de los genes *per* y reprimen los genes *gbmal1a* y *gclock1a*, y restablecen parcialmente la ritmicidad de todos los genes reloj analizados en hígado *in vitro* tras un tratamiento de 2 h con dexametasona, indicando su importancia como factor regulador del funcionamiento del oscilador hepático del carpín.
10. Como conclusión general, el sistema circadiano del carpín, parece estar formado por múltiples osciladores localizados por todo el organismo que trabajan al unísono de manera sincronizada y en fase, sin haberse localizado hasta el momento un oscilador maestro. Además, se muestra que el hígado en este teleósteo es muy sensible a señales procedentes de diferentes localizaciones del organismo y ponen de manifiesto la relevancia de este modelo experimental para entender cómo se realiza la comunicación



entre el sistema endocrino y el sistema circadiano para el mantenimiento de la homeostasis temporal en el organismo.

## Bibliografía

- Albrecht, U. (2012). Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 74, 246–260.
- Arcamone, N., Neglia, S., Gargiulo, G., Esposito, V., Varricchio, E., Battaglini, P., De Girolamo, P. and Russo, F. (2009). Distribution of ghrelin peptide in the gastrointestinal tract of stomachless and stomach-containing teleosts. *Microsc. Res. Tech.* 72, 525–533.
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schütz, G. and Schibler, U. (2000a). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344–2347.
- Facciolo, R. M., Crudo, M., Giusi, G. and Canonaco, M. (2010). GABAergic influences on ORX receptor-dependent abnormal motor behaviors and neurodegenerative events in fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243, 77–86.
- Facciolo, R. M., Crudo, M., Zizza, M., Giusi, G. and Canonaco, M. (2012).  $\alpha$  GABA(A) subunit-orexin receptor interactions activate learning/motivational pathways in the goldfish. *Behav. Brain Res.* 234, 349–356.
- Falcón, J. (1999). Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog. Neurobiol.* 58, 121–162.
- Feliciano, A., Vivas, Y., de Pedro, N., Delgado, M. J., Velarde, E. and Isorna, E. (2011). Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J. Biol. Rhythms* 26, 24–33.
- Folgueira, M., Sueiro, C., Rodríguez-Moldes, I., Yáñez, J. and Anadón, R. (2007). Organization of the *torus longitudinalis* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an immunohistochemical study of the GABAergic system and a Dil tract-tracing study. *J. Comp. Neurol.* 503, 348–370.
- Fukuoka, Y., Burioka, N., Takata, M., Ohdo, S., Miyata, M., Endo, M. and Shimizu, E. (2005). Glucocorticoid administration increases *hPer1* mRNA levels in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* or *in vivo*. *J. Biol. Rhythms* 20, 550–553.
- Hoskins, L. J. and Volkoff, H. (2012). Daily patterns of mRNA expression of two core circadian regulatory proteins, *Clock2* and *Per1*, and two appetite-regulating peptides, OX and NPY, in goldfish (*Carassius auratus*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 163, 127–136.
- Kah, O., Pontet, A., Danger, J. M., Dubourg, P., Pelletier, G., Vaudry, H. and Calas, A. (1989). Characterization, cerebral distribution and gonadotropin release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 69–76.
- Kalsbeek, A. and Fliers, E. (2013). Daily regulation of hormone profiles. *Handb. Exp. Pharmacol.* 185–226.
- LeSauter, J., Hoque, N., Weintraub, M., Pfaff, D. W. and Silver, R. (2009). Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13582–13587.
- López-Olmeda, J. F., Blanco-Vives, B., Pujante, I. M., Wunderink, Y. S., Mancera, J. M. and Sánchez-Vázquez, F. J. (2013). Daily rhythms in the hypothalamus-pituitary-interrenal axis and acute stress responses in a teleost flatfish, *Solea senegalensis*. *Chronobiol. Int.* 30, 530–539.
- Moore, H. A. and Whitmore, D. (2014). Circadian rhythmicity and light sensitivity of the zebrafish brain. *PLoS ONE* 9, e86176.
- Muñoz-Cueto, J. A., Sarasquete, C. and Kah, O. (1998). The *torus longitudinalis* in the gilthead seabream: an undescribed fiber tract link with the valvula *cerebelli*. *Histol. Histopathol.* 13, 391–394.
- Nisembaum, L. G., Velarde, E., Tinoco, A. B., Azpeleta, C., de Pedro, N., Alonso-Gómez, A. L., Delgado, M. J. and Isorna, E. (2012). Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol. Int.* 29, 665–673.
- Nisembaum, L. G., de Pedro, N., Delgado, M. J. and Isorna, E. (2014). Crosstalking between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 205, 287–295.
- Oishi, K., Amagai, N., Shirai, H., Kadota, K., Ohkura, N. and Ishida, N. (2005). Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 12, 191–202.

- Olsson, C., Holbrook, J. D., Bompadre, G., Jönsson, E., Hoyle, C. H. V., Sanger, G. J., Holmgren, S. and Andrews, P. L. R. (2008). Identification of genes for the ghrelin and motilin receptors and a novel related gene in fish, and stimulation of intestinal motility in zebrafish (*Danio rerio*) by ghrelin and motilin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 217–226.
- Pickering, A. D. and Pottinger, T. G. (1983). Seasonal and diel changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 49, 232–239.
- Polakof, S., Ceinos, R. M., Fernández-Durán, B., Míguez, J. M. and Soengas, J. L. (2007). Daily changes in parameters of energy metabolism in brain of rainbow trout: dependence on feeding. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 146, 265–273.
- Reddy, A. B., Maywood, E. S., Karp, N. A., King, V. M., Inoue, Y., Gonzalez, F. J., Lilley, K. S., Kyriacou, C. P. and Hastings, M. H. (2007). Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology* 45, 1478–1488.
- Sakata, I., Mori, T., Kaiya, H., Yamazaki, M., Kangawa, K., Inoue, K. and Sakai, T. (2004). Localization of ghrelin-producing cells in the stomach of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Zoolog. Sci.* 21, 757–762.
- Schmutz, I., Albrecht, U. and Ripperger, J. A. (2012). The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Mol. Cell. Endocrinol.* 349, 38–44.
- Sujino, M., Furukawa, K., Koinuma, S., Fujioka, A., Nagano, M., Iigo, M. and Shigeyoshi, Y. (2012). Differential entrainment of peripheral clocks in the rat by glucocorticoid and feeding. *Endocrinology* 153, 2277–2286.
- Sun, X., Dang, F., Zhang, D., Yuan, Y., Zhang, C., Wu, Y., Wang, Y. and Liu, Y. (2015). Glucagon-CREB/CRTC2 signaling cascade regulates hepatic BMAL1 protein. *J. Biol. Chem.* 290, 2189–2197.
- Tinoco, A. B., Nisembaum, L. G., de Pedro, N., Delgado, M. J. and Isorna, E. (2014). Leptin expression is rhythmic in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). Role of feeding time. *Gen. Comp. Endocrinol.* 204, 239–247.
- Velarde, E., Haque, R., Iuvone, P. M., Azpeleta, C., Alonso-Gómez, A. L. and Delgado, M. J. (2009). Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of *period* and *cryptochrome* transcripts in retina, liver, and gut. *J. Biol. Rhythms* 24, 104–113.
- Weger, M., Weger, B. D., Diotel, N., Rastegar, S., Hirota, T., Kay, S. A., Strähle, U. and Dickmeis, T. (2013). Real-time *in vivo* monitoring of circadian E-box enhancer activity: a robust and sensitive zebrafish reporter line for developmental, chemical and neural biology of the circadian clock. *Dev. Biol.* 380, 259–273.
- Yamamoto, T., Nakahata, Y., Tanaka, M., Yoshida, M., Soma, H., Shinohara, K., Yasuda, A., Mamino, T. and Takumi, T. (2005). Acute physical stress elevates mouse *period1* mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J. Biol. Chem.* 280, 42036–42043.
- Yáñez, J., Busch, J., Anadón, R. and Meissl, H. (2009). Pineal projections in the zebrafish (*Danio rerio*): overlap with retinal and cerebellar projections. *Neuroscience* 164, 1712–1720.
- Yannielli, P. C., Molyneux, P. C., Harrington, M. E. and Golombek, D. A. (2007). Ghrelin effects on the circadian system of mice. *J. Neurosci.* 27, 2890–2895.



## SUMMARY





## Introduction

Today, the vertebrate circadian system is considered as a network of oscillators that work together in a coordinated manner (Albrecht, 2012). With respect to goldfish (*Carassius auratus*), teleostean species object of the present PhD Thesis, the location of the endogenous circadian oscillators that constitute the system has been extensively studied by our research group using quantitative real-time PCR techniques, demonstrating the rhythmic expression of clock genes, molecular components of the oscillators, in brain and peripheral locations (Feliciano et al., 2011; Nisembaum et al., 2012; Velarde et al., 2009). However, no information is available to date on the anatomical location of these oscillators in goldfish and, while there are a few studies reporting this aspect in other teleost species, all of them are limited to the brain (zebrafish (*Danio rerio*), Cermakian et al., 2000, Moore and Whitmore, 2014, Weger et al., 2013, Ziv et al., 2005;.. rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Mazurais et al., 2000; and *Paralichthys olivaceus*, Watanabe et al., 2012), without studying in any case the cellular localization of clock genes in peripheral locations.

Communication between oscillators is one of the issues that raises more interest in chronobiology at present and in this sense, in recent years the liver has been described as one of the endogenous oscillators most sensitive to different systemic and external rhythmic signals in mammals (Albrecht, 2012). Given that this organ is one of the main responsible for energy metabolism and metabolic reserves (Schmutz et al., 2012), its role in the context of communication between this metabolism and the circadian system is being currently studied. Thus, besides the pathways that transmit light information to peripheral oscillators such as the nervous communication, it has been proposed that various hormonal signals would be responsible for the maintenance and proper functioning of clock genes rhythms in these oscillators, with particular relevance in the liver. Thus, it has been demonstrated in mammals that the molecular components of the liver oscillator are regulated by certain hormonal signals such as glucagon (Sun et al., 2015) and glucocorticoids (Balsalobre et al., 2000a; Fukuoka et al., 2005; Oishi et al., 2005; Reddy et al., 2007; Schmutz et al., 2012; Sujino et al., 2012; Yamamoto et al., 2005). In the case of goldfish, previous studies of our research group have shown the presence of the typical molecular machinery of endogenous oscillators, clock genes, in the liver and their regulation by both the light / dark cycle and the feeding time (Feliciano et al., 2011; Tinoco et al., 2014; Velarde et al., 2009).

This PhD Thesis has as **general objective** the study of the communication pathways between the different endogenous oscillators of goldfish. To this aim, first the anatomical

distribution of goldfish endogenous oscillators in central and peripheral locations was analyzed and their functionality was studied, revealed as the existence of daily rhythmicity of clock gene expression in these areas. Then, two hormonal signals that could be able to act as inputs of the circadian system were analyzed: the ghrelinergic system, of whom both the anatomic location and daily expression pattern were studied, and glucocorticoids, particularly cortisol, of whom their daily pattern of plasma concentration was also studied. Finally, the liver was used as a model to study the effects of different circadian signals from different sources in the body. For this, we selected ghrelin, whose main place of endogenous synthesis is the gastrointestinal tract, and cortisol, synthesized at interrenal level. Thus, the impact of both hormones on the functionality of the liver oscillator was analyzed understood as the modulation of clock genes expression in this location.

## Research content

### 1. Anatomical distribution of circadian oscillators of goldfish.

In order to investigate the anatomical location of circadian oscillators in brain and peripheral areas of the goldfish, a partial sequence of *gper1b* (clock gene not previously studied in this species) was first cloned, and then *in situ* hybridization was performed in goldfish maintained under 12 hours of light and 12 hours of darkness (12L: 12D) conditions and daily fed two hours after turning on the lights (ZT 2). Under these conditions, samples of brain tissue, pituitary, liver and foregut were obtained at the end of the light period and at the end of the dark period, and *gper1b* gene expression was studied by *in situ* hybridization. The results show the presence of the clock gene mRNA in all tissues examined (brain, pituitary, anterior intestine and liver). Specifically, the distribution observed in the brain matches the one previously described for the zebrafish (Weger et al., 2013). Many of the brain locations that show *gper1b* expression have been previously linked in teleosts to the light detection via connections with the retina (Folgueira et al., 2007; Moore and Whitmore, 2014; Muñoz-Cueto et al., 1998) or the pineal gland (Falcon, 1999; Yañez et al., 2009), as well as to systems of regulation of intake such as the orexinergic (Facciolo et al., 2010; Facciolo et al., 2012) or the NPYergic (Hoskins and Volkoff, 2012; Kah et al., 1989). In the case of peripheral locations, *gper1b* is widely expressed in pituitary and liver in almost all cells, while in the foregut appears in all layers but in isolated cells (mucosa, submucosa and muscular).

Furthermore, the results show the importance of this gene in the context of the molecular oscillators' functionality as revealed by its ability to display a rhythmic expression pattern close to 24 h, with a lag of about 12 hours between genes from positive limb and

genes from negative one from the molecular machinery of the oscillator. This rhythmicity is evidenced by *in situ* hybridization study as a difference in signal intensity depending on the time of sampling, and confirmed with a subsequent study in which the same tissue samples were collected in goldfish maintained under the same conditions in order to study gene expression by quantitative real-time PCR. Also, the coordination between different oscillators is shown in all tissues studied, given that the maximal expression is found to be in phase during the dark phase of photocycle, anticipating the arrival of the light and food. Furthermore, each of the clock genes analyzed show a different amplitude, suggesting that each oscillator of the circadian system has a different sensitivity to the various signals received.

## 2. Anatomical distribution of ghrelinergic system.

On the other hand, the anatomical distribution of the ghrelinergic system has been analyzed, since ghrelin has been recently linked with the circadian system in the goldfish (Nisembaum et al., 2014). To this aim, the presence of ghrelin and its receptor GHS-R1a was studied by *in situ* hybridization. In this sense, present results confirm the previously reported anatomical organization of ghrelin in the gastrointestinal tract of teleosts (Arcamone et al., 2009; Olsson et al., 2008; Sakata et al., 2004). Furthermore, in this Thesis it is presented for the first time in teleosts the anatomical distribution of the receptor GHS-R1a mRNA. Specifically, it appears in all layers of different regions of proximal intestine (esophagus, intestinal bulb, "J" loop and anterior intestine) and in the brain. Its presence is specially relevant in hypothalamus and other locations that coincide with areas previously related with food intake regulatory systems in teleosts, such as the orexinergic (Facciolo et al., 2010; Facciolo et al., 2012.) and the NPYergic (Hoskins and Volkoff, 2012; Kah et al., 1989), the last one the most related to the central action of ghrelin in the regulation of food intake. Moreover, the co-expression of ghrelin and its receptor with the circadian system could be suggested in the same peripheral and brain areas, both being located in similar areas, supporting the hypothesis that this hormone can act as input signal to the circadian system in goldfish.

## 3. Daily rhythmicity of two possible synchronizing signals: ghrelin and glucocorticoids.

In general, for a signal to be considered a good candidate to be an input or a synchronizer of the circadian system a requirement is that it displays a daily rhythmic profile. While both ghrelin and glucocorticoids have been proposed as potential modulating signals of endogenous oscillators in mammals (Balsalobre et al., 2000; LeSauter et al., 2009; Yamamoto et al., 2005; Yannielli et al., 2007), there is no information on the existence of ghrelin daily rhythms in fish and there are very few studies on glucocorticoid rhythms.



Here, as part of this PhD Thesis, the daily pattern of *preproghrelin* and *ghs-r1a* expression in hypothalamus, pituitary and gastrointestinal tract was studied, as well as the plasmatic levels of cortisol, the main glucocorticoid in teleosts. In all cases goldfish were maintained under the same previously described conditions (12L:12D eating daily at ZT 2).

The results described for the first time in teleosts the presence of a daily pattern of expression of ghrelin and GHS-R1a receptor mRNAs in hypothalamus and gastrointestinal tract, with the acrophases in phase with genes belonging to the negative feedback loop (*per* and *cry* genes) in goldfish maintained under the same conditions, supporting the theory that this hormone is an output of the circadian system in teleosts. Meanwhile, plasma cortisol levels show the same profile with the maximum concentration during the dark phase, anticipating the activity period, which coincides with previous reports in other teleosts (López-Olmeda et al., 2013; Pickering and Pottinger, 1983; Polakof et al., 2007) and mammals (Kalsbeek and Fliers, 2013).

#### 4. Hepatic oscillator functioning.

In order to go deep into the functioning of the hepatic oscillator of goldfish, the daily expression profile of clock genes of goldfish maintained under 12L:12D conditions and daily fed at ZT 2 was analyzed. The results show a functional molecular oscillator in the liver of goldfish under the experimental conditions tested, i.e., in the presence of the most important environmental synchronizers (light-dark cycle and feeding schedule). Moreover, previous results obtained by our research group show the maintenance of these daily rhythms of clock gene expression in the absence of only one of the main external synchronizers, although the amplitude of these rhythms is slightly damped, results that are shown in the present manuscript in the review of the liver as a goldfish oscillator and which demonstrate the critical role of both synchronizers for the optimal functioning of this endogenous oscillator.

Finally, liver isolation from any systemic signal by its extraction for culturing causes a disappearance of almost all the rhythms of clock genes analyzed, except of *gper1b* gene which is maintained but with a very reduced amplitude, suggesting that the presence of the physiological signals lost in *in vitro* conditions are necessary and probably responsible for the coordination between the different regulatory liver cells as well as regulators of the amplitude of these clock genes.

## 5. Effect of ghrelin and glucocorticoids on liver oscillator *in vitro* and *in vivo*.

Once the daily rhythmicity of the two hormones studied, ghrelin and glucocorticoids, was demonstrated, we continued to study their possible role as modulators of the hepatic oscillator in a goldfish hepatic culture model. For this purpose, the animals were kept in conditions of 12L: 12D in all cases and sacrificed at ZT 2 for the extraction of the liver and the beginning of the cultures (constant light and  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ). First, the effect of a treatment with ghrelin on the expression of clock genes was studied, characterizing that response by using a hormone antagonist and specific drugs of different intracellular transduction pathways previously related with the action of the hormone. Then, other studies were conducted to determine the effect of glucocorticoids on the expression of clock genes in cultured liver using cortisol or dexamethasone and analyzing both short term (hours) and long term (days) effects.

The results obtained let us establish both ghrelin and glucocorticoids as modulating signals of the hepatic oscillator of goldfish through exerting changes on the levels of expression of clock genes. Specifically, in this PhD Thesis it is shown for the first time a direct action of ghrelin on the hepatic oscillator *in vitro*, although previous results in our group showed the action of ghrelin as a clock genes modulator when injected in goldfish (Nisembaum et al., 2014). Furthermore, the presence of the receptor GHS-R1a in liver cells of the goldfish suggests that the action of ghrelin could be mediated by this receptor subtype. Also, it is shown for the first time in teleosts that the PLC-PKC pathway is the main pathway involved in the intracellular signal transduction of ghrelin to exert its modulatory effect of clock genes and the involvement of the AC-PKA pathway in the modulation of *gbmal1a* and *grev-erba* expression.

Regarding glucocorticoids, it is shown for the first in teleosts their effect as a modulator of clock genes in the liver in both *in vivo* conditions (as revealed as IP injections of animals kept under 12L: 12D conditions and daily fed at ZT 2) and in cultured liver, demonstrating its action directly on hepatic cells. Furthermore, glucocorticoids are able to induce the synchronization of the hepatic oscillator in liver explants *in vitro*. Although glucocorticoids appear to have a role as synchronizers in the culture liver of goldfish they do not seem to be the only signal involved in the rhythms observed *in vivo*, as in no case the establishment of the maximal amplitude observed in the liver *in vivo* is achieved, suggesting that the establishment of the rhythms of clock genes and its strength, defined as its amplitude, must be the result of a set of different rhythmic signals received by the liver under physiological conditions.

## Conclusions

From these results the following conclusions are proposed:

1. The circadian system consists of a network of functional endogenous oscillators distributed in central and peripheral areas, considering as oscillators those locations that show *gper1b* clock gene expression. These oscillators are functional and in phase under 12L: 12D and daily fed at ZT 2 with the acrophase during the night time anticipating the food and light arrival, and show different amplitudes, suggesting a different sensitivity to the environmental signals.
2. The *preproghrelin* and *ghs-r1a* genes are expressed in a multitude of areas where the presence of *gper1b* was detected both in the brain and in the gastrointestinal tract, supporting its potential role as a regulator of the circadian system.
3. In the brain there are transcripts of *gper1b* and *ghs-r1a* genes in locations related to sensitive areas or areas related with food intake and energy balance regulatory systems, demonstrating the anatomical connection between energy homeostasis and the circadian system.
4. Both *preproghrelin* as its receptor *ghs-r1a* show daily expression profiles in phase with the maximum of *gper1b* in goldfish held under conditions of 12L: 12D and daily fed at ZT 2, suggesting that this system is an output of the circadian system of goldfish.
5. Plasmatic cortisol levels in goldfish kept under conditions of 12L: 12D and daily fed at ZT 2 show a daily profile of concentration with a peak in the scotophase, before the beginning of the active phase, supporting a possible role for this hormone as an "awakening hormone", as described for other vertebrates.
6. The hepatic oscillator of goldfish is a functional oscillator in phase with the rest of the body oscillators. In culture (i.e., when it is isolated), the hepatic clock genes lose their daily rhythmicity, except for *gper1b* gene although with a significantly reduced amplitude, indicating the need of certain physiological signals for maintaining the functioning of hepatic oscillator of goldfish.
7. The hepatic oscillator of goldfish, like the mammalian, is sensitive to endogenous signals such as ghrelin and glucocorticoid, hormones that can modulate the expression of clock genes in the liver of this species. Specifically, both hormones exert different effects on the expression of clock genes.

8. In this sense, ghrelin induces the expression of all analyzed genes, regardless of whether they are negative elements (*per* genes), positive (*gbmal1a* and *gclock1a*) or from the auxiliary loop (*grev-erba*). This hormone acts through its own receptors mainly via the PLC- PKC pathway and partly via AC-PKA (in the case of *gbmal1a* and *grev-erba* genes).
9. Glucocorticoids, for their part, induce the expression of *per* genes, repress *gbmal1a* and *gclock1a* genes, and partially restore the clock rhythmicity of all genes analyzed *in vitro* in liver after 2 h treatment with dexamethasone, indicating its importance as a regulating factor of the hepatic oscillator of goldfish.
10. As a general conclusion, the circadian system of goldfish seems to be composed of multiple oscillators located throughout the body working synchronously and in phase, without a master oscillator. Furthermore, we show that the liver in this teleost is very sensitive to signals from different areas of the body and we show the relevance of this experimental model to understand how the communication between the endocrine system and circadian system takes place in order to maintain temporary homeostasis in the body.

## Bibliography

- Albrecht, U. (2012). Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 74, 246–260.
- Arcamone, N., Neglia, S., Gargiulo, G., Esposito, V., Varricchio, E., Battaglini, P., De Girolamo, P. and Russo, F. (2009). Distribution of ghrelin peptide in the gastrointestinal tract of stomachless and stomach-containing teleosts. *Microsc. Res. Tech.* 72, 525–533.
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schütz, G. and Schibler, U. (2000a). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344–2347.
- Facciolo, R. M., Crudo, M., Giusi, G. and Canonaco, M. (2010). GABAergic influences on ORX receptor-dependent abnormal motor behaviors and neurodegenerative events in fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243, 77–86.
- Facciolo, R. M., Crudo, M., Zizza, M., Giusi, G. and Canonaco, M. (2012).  $\alpha$  GABA(A) subunit-orexin receptor interactions activate learning/motivational pathways in the goldfish. *Behav. Brain Res.* 234, 349–356.
- Falcón, J. (1999). Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog. Neurobiol.* 58, 121–162.
- Feliciano, A., Vivas, Y., de Pedro, N., Delgado, M. J., Velarde, E. and Isorna, E. (2011). Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J. Biol. Rhythms* 26, 24–33.
- Folgueira, M., Sueiro, C., Rodríguez-Moldes, I., Yáñez, J. and Anadón, R. (2007). Organization of the *torus longitudinalis* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an immunohistochemical study of the GABAergic system and a Dil tract-tracing study. *J. Comp. Neurol.* 503, 348–370.
- Fukuoka, Y., Burioka, N., Takata, M., Ohdo, S., Miyata, M., Endo, M. and Shimizu, E. (2005). Glucocorticoid administration increases *hPer1* mRNA levels in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* or *in vivo*. *J. Biol. Rhythms* 20, 550–553.
- Hoskins, L. J. and Volkoff, H. (2012). Daily patterns of mRNA expression of two core circadian regulatory proteins, *Clock2* and *Per1*, and two appetite-regulating peptides, OX and NPY, in goldfish (*Carassius auratus*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 163, 127–136.
- Kah, O., Pontet, A., Danger, J. M., Dubourg, P., Pelletier, G., Vaudry, H. and Calas, A. (1989). Characterization, cerebral distribution and gonadotropin release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 69–76.
- Kalsbeek, A. and Fliers, E. (2013). Daily regulation of hormone profiles. *Handb. Exp. Pharmacol.* 185–226.

- LeSauter, J., Hoque, N., Weintraub, M., Pfaff, D. W. and Silver, R. (2009). Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13582–13587.
- López-Olmeda, J. F., Blanco-Vives, B., Pujante, I. M., Wunderink, Y. S., Mancera, J. M. and Sánchez-Vázquez, F. J. (2013). Daily rhythms in the hypothalamus-pituitary-interrenal axis and acute stress responses in a teleost flatfish, *Solea senegalensis*. *Chronobiol. Int.* 30, 530–539.
- Moore, H. A. and Whitmore, D. (2014). Circadian rhythmicity and light sensitivity of the zebrafish brain. *PLoS ONE* 9, e86176.
- Muñoz-Cueto, J. A., Sarasquete, C. and Kah, O. (1998). The *torus longitudinalis* in the gilthead seabream: an undescribed fiber tract link with the valvula cerebelli. *Histol. Histopathol.* 13, 391–394.
- Nisembaum, L. G., Velarde, E., Tinoco, A. B., Azpeleta, C., de Pedro, N., Alonso-Gómez, A. L., Delgado, M. J. and Isorna, E. (2012). Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol. Int.* 29, 665–673.
- Nisembaum, L. G., de Pedro, N., Delgado, M. J. and Isorna, E. (2014). Crosstalk between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 205, 287–295.
- Oishi, K., Amagai, N., Shirai, H., Kadota, K., Ohkura, N. and Ishida, N. (2005). Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 12, 191–202.
- Olsson, C., Holbrook, J. D., Bompadre, G., Jönsson, E., Hoyle, C. H. V., Sanger, G. J., Holmgren, S. and Andrews, P. L. R. (2008). Identification of genes for the ghrelin and motilin receptors and a novel related gene in fish, and stimulation of intestinal motility in zebrafish (*Danio rerio*) by ghrelin and motilin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 217–226.
- Pickering, A. D. and Pottinger, T. G. (1983). Seasonal and diel changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 49, 232–239.
- Polakof, S., Ceinos, R. M., Fernández-Durán, B., Míguez, J. M. and Soengas, J. L. (2007). Daily changes in parameters of energy metabolism in brain of rainbow trout: dependence on feeding. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 146, 265–273.
- Reddy, A. B., Maywood, E. S., Karp, N. A., King, V. M., Inoue, Y., Gonzalez, F. J., Lilley, K. S., Kyriacou, C. P. and Hastings, M. H. (2007). Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology* 45, 1478–1488.
- Sakata, I., Mori, T., Kaiya, H., Yamazaki, M., Kangawa, K., Inoue, K. and Sakai, T. (2004). Localization of ghrelin-producing cells in the stomach of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Zoolog. Sci.* 21, 757–762.
- Schmutz, I., Albrecht, U. and Ripperger, J. A. (2012). The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Mol. Cell. Endocrinol.* 349, 38–44.
- Sujino, M., Furukawa, K., Koinuma, S., Fujioka, A., Nagano, M., Iigo, M. and Shigeyoshi, Y. (2012). Differential entrainment of peripheral clocks in the rat by glucocorticoid and feeding. *Endocrinology* 153, 2277–2286.
- Sun, X., Dang, F., Zhang, D., Yuan, Y., Zhang, C., Wu, Y., Wang, Y. and Liu, Y. (2015). Glucagon-CREB/CRTC2 signaling cascade regulates hepatic BMAL1 protein. *J. Biol. Chem.* 290, 2189–2197.
- Tinoco, A. B., Nisembaum, L. G., de Pedro, N., Delgado, M. J. and Isorna, E. (2014). Leptin expression is rhythmic in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). Role of feeding time. *Gen. Comp. Endocrinol.* 204, 239–247.
- Velarde, E., Haque, R., Iuvone, P. M., Azpeleta, C., Alonso-Gómez, A. L. and Delgado, M. J. (2009). Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of period and cryptochrome transcripts in retina, liver, and gut. *J. Biol. Rhythms* 24, 104–113.
- Weger, M., Weger, B. D., Diotel, N., Rastegar, S., Hirota, T., Kay, S. A., Strähle, U. and Dickmeis, T. (2013). Real-time in vivo monitoring of circadian E-box enhancer activity: a robust and sensitive zebrafish reporter line for developmental, chemical and neural biology of the circadian clock. *Dev. Biol.* 380, 259–273.
- Yamamoto, T., Nakahata, Y., Tanaka, M., Yoshida, M., Soma, H., Shinohara, K., Yasuda, A., Mamime, T. and Takumi, T. (2005). Acute physical stress elevates mouse *period1* mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J. Biol. Chem.* 280, 42036–42043.
- Yáñez, J., Busch, J., Anadón, R. and Meissl, H. (2009). Pineal projections in the zebrafish (*Danio rerio*): overlap with retinal and cerebellar projections. *Neuroscience* 164, 1712–1720.
- Yannielli, P. C., Molyneux, P. C., Harrington, M. E. and Golombek, D. A. (2007). Ghrelin Effects on the Circadian System of Mice. *J. Neurosci.* 27, 2890–2895.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Ritmos biológicos y sistema circadiano

- 1.1. Base molecular de los relojes endógenos
- 1.2. Organización funcional del sistema circadiano

## 2. Señales sincronizadoras

- 2.1. Señales ambientales externas
- 2.2. Señales internas
  - 2.2.1. Ghrelina
  - 2.2.2. Glucocorticoides

## 3. El carpín dorado: características de la especie





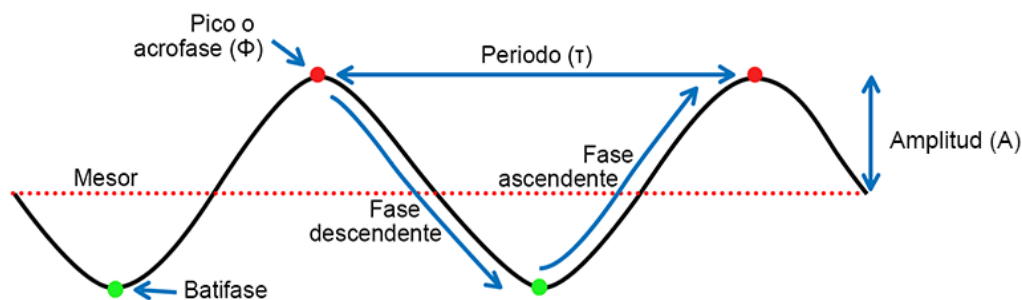
## 1. RITMOS BIOLÓGICOS Y SISTEMA CIRCADIANO.

La sucesión de los días y las noches, así como de las estaciones del año debidas a los movimientos de rotación y traslación de la Tierra, al igual que el ciclo lunar, han supuesto una gran presión evolutiva para todos los organismos, que han adaptado sus procesos vitales a estos cambios ambientales cíclicos (Pittendrigh, 1993). La percepción de la ritmicidad de estos cambios ha permitido a los diversos organismos anticiparse a ellos generando una serie de respuestas cíclicas tanto de tipo comportamental (ciclos sueño/vigilia, actividad/reposo, etc) como fisiológico (secreción hormonal, periodos reproductores, temperatura corporal, etc) (Madrid, 2006; Refinetti, 2006) consiguiéndose una sincronización temporal entre los organismos y su entorno traducible en una mejor adaptación y, por tanto, una ventaja selectiva de gran importancia para la supervivencia. De esta forma, las respuestas de anticipación u homeostasis predictiva, realizadas por los diferentes organismos están definidas como repeticiones periódicas de distintos procesos biológicos a nivel interno predecibles en el tiempo (Refinetti, 2006).

Para poder definir los distintos ritmos biológicos, en Cronobiología se emplean una serie de parámetros característicos expresados en unidades numéricas que definen los diferentes ritmos biológicos permitiendo su cuantificación (Koukkari y Sothorn, 2006; figura I.1).

- **Periodo ( $\tau$ ):** Intervalo de tiempo entre dos acontecimientos idénticos, es decir, la duración de un ciclo completo. La frecuencia sería la inversa del periodo.
- **Nivel medio (mesor):** valor medio de la variable estudiada, calculado a lo largo de un periodo completo.
- **Amplitud (A):** si se ajusta a un perfil sinusoidal (figura I.1), es definida como la diferencia entre el mesor y el valor máximo alcanzado por la variable durante el periodo. En el caso de perfiles no sinusoidales será la diferencia entre el punto máximo y el mínimo observados en el ritmo.
- **Fase ( $\phi$ ):** describe la relación temporal entre dos o más ritmos. Este término se utiliza también en ocasiones, para definir una parte del ciclo; así por ejemplo, se habla de fase ascendente, descendente, máxima... de un fenómeno rítmico. Se denomina acrofase al pico máximo y batifase al valle.





**Figura I.1. Representación de los parámetros rítmicos característicos sobre una onda sinusoidal.**

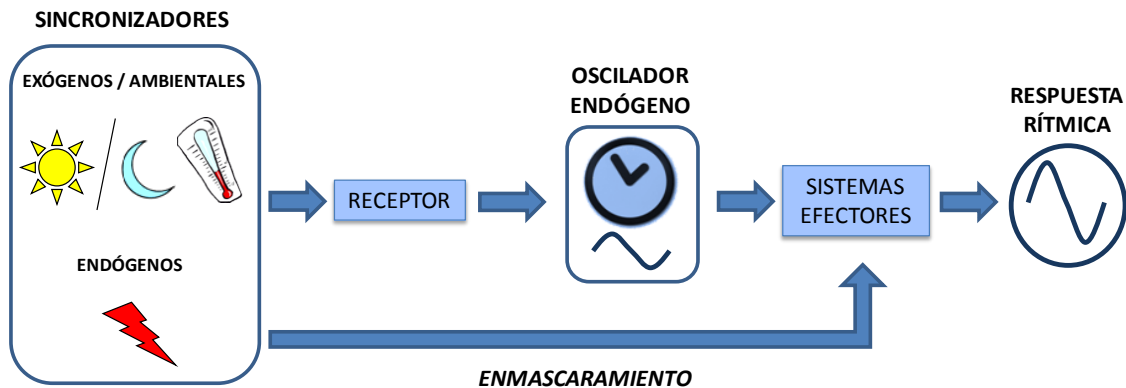
Por otro lado, según el origen del ritmo, los ritmos pueden considerarse de carácter exógeno cuando se generan como respuesta reacción a un cambio ambiental y desaparecen inmediatamente después de retirar el estímulo rítmico, o endógenos cuando persisten en condiciones ambientales de curso libre o *free running*, es decir, en ausencia de estímulos rítmicos externos. Para que un ritmo se considere endógeno tiene que haber evidencias de que no es consecuencia pasiva de una oscilación ambiental y que existe un reloj biológico interno (*oscilador*) que mantiene el ritmo con un periodo invariable y característico (Aschoff, 1981). Estos osciladores fueron descritos por primera vez en 1960 (Pittendrigh, 1960).

En función del periodo, los ritmos endógenos o de curso libre pueden clasificarse en ultradianos (con un período inferior a 19 h), circadianos (con un período alrededor de las 24 h) e infradianos (con un período superior a 29 h).

Los ritmos circadianos están sincronizados principalmente por el ciclo luz/oscuridad y son los más estudiados por el alto impacto que la presencia/ausencia de luz supone para la mayoría de los seres vivos (afectando a factores tan importantes como la temperatura, la disponibilidad de alimento o la presencia de depredadores). Los estímulos externos pueden actuar como sincronizadores ("*zeitgebers*"), modificando el funcionamiento del oscilador endógeno de manera que el periodo del reloj interno se ajuste al periodo del estímulo ambiental (sincronización o "encarrilamiento") (Cahill y Besharse, 1993). Es importante diferenciar esta sincronización propiamente dicha del enmascaramiento ("*masking*") producido cuando los estímulos ambientales actúan directamente sobre el sistema efector, generando un ritmo observable, pero no sincronizado, que desaparece al retirar el estímulo (Cambras Riu, 2006). Sin embargo, en la práctica, es difícil diferenciar entre ambos fenómenos debido a que gran parte de los sincronizadores ejercen al mismo tiempo un efecto enmascarador (Madrid et al., 2001).

Así, para generar un ritmo biológico endógeno son necesarios los siguientes elementos (figura 1.2):

- Una entrada (*input*) que puede ser un estímulo endógeno o ambiental y que sincroniza el reloj.
- Un oscilador (*pacemaker* o marcapasos), que es un sistema capaz de generar por sí mismo la oscilación.
- Una salida (*output*) en forma de ritmo observable.



**Figura 1.2. Esquema mostrando los principales elementos de un sistema circadiano.** El oscilador recibirá los estímulos con los que puede acoplar el ritmo a través de diferentes receptores y genera una serie de respuestas rítmicas que serán originadas por los sistemas efectores. En el caso del enmascaramiento, los estímulos sincronizadores afectarán de forma directa al sistema efector, sin pasar por el oscilador endógeno.

### 1.1. BASE MOLECULAR DE LOS RELOJES ENDÓGENOS.

En las últimas décadas se han llevado a cabo multitud de estudios en una gran diversidad de organismos, sentando las bases genéticas de los ritmos circadianos. Desde hace más de tres décadas, se conoce la existencia de los llamados **genes reloj** gracias a estudios que generaron mutantes con fenotipos circadianos alterados en *Drosophila melanogaster*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Neurospora crassa* (Bruce, 1972; Feldman y Hoyle, 1973; Konopka y Benzer, 1971). Estos genes son componentes moleculares del reloj que codifican proteínas que posibilitan la generación y el control de los ritmos biológicos.

Los mecanismos moleculares que subyacen a los osciladores circadianos se basan en bucles de retroalimentación entre los procesos de transcripción y traducción de los genes reloj y sus productos proteicos (Buhr y Takahashi, 2013; Panda et al., 2002a; Partch et al., 2014). Estos bucles se encuentran tanto en los osciladores encefálicos como en los periféricos (Balsalobre et al., 2000; Panda et al., 2002a; Reppert y Weaver, 2002) y, además, aparecen

muy conservados a lo largo de la filogenia desde organismos unicelulares hasta los mamíferos (Panda et al., 2002a).

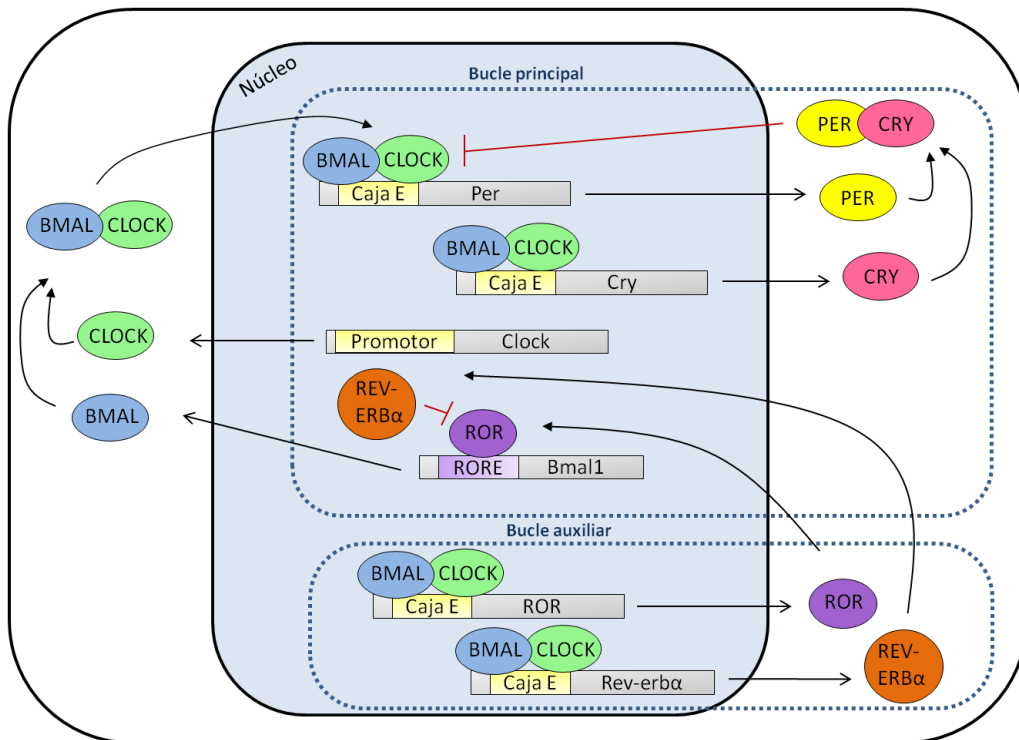
Los genes reloj regulan su propia expresión mediante mecanismos de retroalimentación positiva y negativa que generan como resultado una oscilación de su transcripción con un periodo aproximado a las 24 h, típico de un ritmo circadiano (figura 1.3).

En vertebrados, los elementos positivos de estos bucles de retroalimentación son los factores de transcripción *Clock* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) y *Bmal1* (también conocido como *Arntl*, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like*). Los productos proteicos de ambos genes heterodimerizan gracias a un dominio PAS (*Period-Arnt-Single-minded*; Huang et al., 2012) y facilitan la expresión de los elementos negativos gracias a una región bHLH (*basic-Helix-Loop-Helix*) que reconoce las secuencias reguladoras denominadas cajas E (E-box; CACGTG), presentes en los promotores de los genes y que contienen la información para iniciar la transcripción de los elementos negativos, los genes *Period*, *Per*, y *Cryptochrome*, *Cry* (Hastings et al., 2007; Partch et al., 2014; Reppert y Weaver, 2002). Por su parte, los elementos negativos, una vez que son transcritos y traducidos a proteínas, sufren ciertas modificaciones postransduccionales en el citoplasma, como la fosforilación de la proteína PER por varias caseína kinasas (Vanselow y Kramer, 2007), heterodimerizan y retornan al núcleo, donde actúan como inhibidores de su propia transcripción, mediante la inhibición de los complejos heterodiméricos CLOCK-BMAL1 (Partch et al., 2014). Este bucle negativo proporciona una ritmicidad diaria a la expresión de los genes *Per* y *Cry*.

Para conseguir estabilizar la duración del ciclo existen además diversos bucles accesorios de los cuales el mejor conocido es el que implica a dos receptores huérfanos nucleares: *Rev-Erb $\alpha$*  y *ROR $\alpha$*  (Preitner et al., 2002; Sato et al., 2004). Estos dos elementos presentan una transcripción regulada igualmente por el heterodímero CLOCK:BMAL1, y se ven inhibidos por los elementos negativos al tiempo que éstos se autoinhiben. Además, el gen *Bmal1* presenta en su promotor un elemento RORE de respuesta a proteínas REV-ERB $\alpha$  y ROR $\alpha$ , que actúan inhibiendo su transcripción o activándola, respectivamente, estableciendo como pico máximo de expresión de este gen en antifase con los picos máximos de expresión de los elementos negativos (Iuvone et al., 2005; Hastings et al., 2008).

Por último, los dímeros CLOCK:BMAL1 activan la transcripción de los considerados como salidas moleculares del reloj y que son parte de los denominados genes controlados por el reloj (CCGs) mediante cajas E situadas en sus promotores. Actualmente, mediante estudios

realizados con microarrays se ha demostrado que casi el 5% del total de los ARN mensajeros (ARNm) presentan un patrón de expresión rítmico (Ripperger y Albrecht, 2009). Entre ellos, se encuentran ARNm que codifican para enzimas metabólicas, canales iónicos y diferentes péptidos (Bozek et al., 2009; Mazzocchi et al., 2012; Panda et al., 2002b; Ripperger y Albrecht, 2009; Storch et al., 2002) como por ejemplo componentes del metabolismo energético hepático en mamíferos (Panda et al., 2002b).



**Figura I.3. Esquema mostrando los principales elementos del oscilador molecular.** El bucle principal está formado por los elementos positivos CLOCK y BMAL1 que activan la transcripción de los elementos negativos *per* y *cry* que al traducirse se heterodimerizan e inhiben al dímero CLOCK-BMAL1. Este bucle se repite con un periodo cercano a 24 h y se estabiliza mediante los genes del bucle auxiliar *ROR* y *rev-erbα* que actúan regulando la expresión del gen *bmal1*. Al mismo tiempo, el dímero CLOCK-BMAL1 actúa modulando la expresión de otros genes denominados “genes controlados por el reloj” o “*clock-controlled genes*”. Modificado de Buhr y Takahashi, 2013.

En el caso de los mecanismos moleculares subyacentes a la generación y mantenimiento de la ritmicidad circadiana en los peces teleósteos, el animal más estudiado ha sido el pez cebra (*Danio rerio*), del cual se han clonado los genes reloj homólogos a los presentes en mamíferos y han sido analizados sus patrones de expresión.

Una de las principales diferencias entre ambos grupos de animales, peces y mamíferos, es el número de genes de las familias *period* y *cryptochrome*, que en peces teleósteos es muy superior debido a los fenómenos de duplicación genómica experimentada por este grupo de vertebrados (Cahill, 2002; Kobayashi et al., 2000; Wang, 2008a; Wang, 2008b; Wang, 2009).

En el caso del carpín dorado, la especie de estudio en la presente Tesis, en la actualidad, nuestro grupo de investigación ha clonado varios de los múltiples genes reloj que forman el oscilador molecular en esta especie. Entre ellos, genes tanto del bucle positivo (*gbmal1a*) como del negativo de las familias *period* (*gper1a*, *gper2a* y *gper3*) y *cryptochrome* (*gcry1a*, *gcry2a* y *gcry3*). Asimismo, se han realizado estudios de la regulación de dichos genes observándose su regulación por el ciclo luz oscuridad y el horario de alimentación (Feliciano et al., 2011; Nisembaum et al., 2012; Tinoco et al., 2014) y hormonas como la orexina y la ghrelina (Nisembaum et al., 2014a; Nisembaum et al., 2014b) en localizaciones tanto centrales como periféricas.

## 1.2. ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DEL SISTEMA CIRCADIANO.

La presencia de la maquinaria molecular necesaria para la existencia de un reloj endógeno ha sido ampliamente demostrada en multitud de tipos celulares (Kaeffer and Pardini, 2005; Schibler, 2006). Sin embargo, el sistema circadiano de los seres multicelulares presenta una organización bastante más compleja basada en la sincronización y el funcionamiento coordinado de distintos osciladores endógenos localizados en diferentes áreas del organismo con el fin de capacitar a los seres vivos para captar estas señales rítmicas, integrarlas y elaborar respuestas efectivas. Así, actualmente la teoría más aceptada sobre la organización funcional del circadiano presenta este como una red de osciladores endógenos intercomunicados (Albrecht, 2012; Bosler et al., 2015; Dibner y Schibler, 2015).

En el caso de los mamíferos, el sistema más estudiado, existe un oscilador principal situado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) que es el encargado tanto de generar procesos fisiológicos rítmicos como de coordinar al resto de osciladores, que dependen en gran medida de él (Albrecht, 2012; Partch et al., 2014; Reppert y Weaver, 2002). En estos animales, la eliminación quirúrgica del NSQ conlleva en multitud de casos la desaparición de ritmos de salida evidentes como los ritmos de actividad locomotora (Schwartz y Zimmerman, 1991; Stephan y Zucker, 1972), que puede recuperarse mediante un transplante de NSQ (Ralph et al., 1990; Silver et al., 1996). Además, su eliminación produce la desaparición de ritmos periféricos como el ritmo de corticosterona (Moore y Eichler, 1972) y la desincronización o el desacoplamiento de los ritmos del resto de osciladores subordinados situados por todo el organismo (Pardini y Kaeffer, 2006). Todos estos hechos apoyan la teoría de que este oscilador endógeno sea el máster o maestro que controle el sistema circadiano de los mamíferos.

Estudios anatómicos han permitido realizar un mapeo exhaustivo de osciladores endógenos en el encéfalo de mamíferos. Se ha encontrado la expresión de genes reloj en multitud de localizaciones además del núcleo supraquiasmático (NSQ; Abe et al., 2002; Amir et al., 2004; Gerstner et al., 2006; Oishi et al., 2000; Shieh et al., 2005; van der Veen et al., 2006) entre las que se encuentran otros núcleos hipotalámicos (Abe et al., 2002; Gerstner et al., 2006; Girotti et al., 2009; Shieh et al., 2005) varios núcleos del sistema límbico y sus conexiones con el hipotálamo (Amir et al., 2004; Lamont et al., 2005; Namihira et al., 1999; Reick et al., 2001; Wakamatsu et al., 2001), la glándula pineal (Abe et al., 2002; Namihira et al., 1999; Simonneaux et al., 2004), núcleos del rafe conectados directamente con el NSQ (Abe et al., 2002) la corteza cerebral (Rath et al., 2013; Wakamatsu et al., 2001), el cerebelo (Mendoza et al., 2010; Namihira et al., 1999) y algunas regiones relacionadas con el sistema olfativo (Abe et al., 2002; Namihira et al., 1999; Nolasco et al., 2012; Wakamatsu et al., 2001).

Por otro lado, además de los osciladores presentes en áreas encefálicas, diferentes estudios de inmunohistoquímica, hibridación *in situ* y PCR han permitido identificar ritmos de genes reloj en localizaciones periféricas como la hipófisis, retina, hígado, corazón, músculo, tejido adiposo, páncreas, intestino, riñón, pulmones, ovario y glándula suprarrenal (Balsalobre et al., 2000; Bass y Takahashi, 2010; Brown et al., 2002; García-Fernández et al., 2007; Girotti et al., 2009; Mühlbauer et al., 2004; Peirson et al., 2006; Sládek et al., 2007; Zvonic et al., 2006).

En el caso de los vertebrados no mamíferos, el modelo de organización aceptado en la actualidad sugiere un sistema de osciladores múltiples acoplados entre sí en el que no destaca ninguna estructura como oscilador principal, es decir, es menos jerarquizado que el sistema de mamíferos (Mazurais et al., 2000; Moore y Whitmore, 2014; Weger et al., 2013). Si bien, el homólogo anatómico del NSQ de mamíferos ha sido encontrado en otros vertebrados como los peces (Moore y Whitmore, 2014; Rink y Wullimann, 2004; Watanabe et al., 2012) no ha podido demostrarse su papel como oscilador maestro en estos animales. En éstos son de especial importancia estructuras encefálicas como la retina neural, la glándula pineal y ciertos núcleos hipotalámicos que actúan conjuntamente para producir una ritmicidad estable (Menaker et al., 1997).

En vertebrados no mamíferos existe mucha menos información de la localización anatómica de la expresión de los genes reloj, ya que la gran mayoría de los estudios sobre el sistema circadiano en estos animales se ha realizado mediante técnicas de PCR. Así, actualmente se conoce la presencia de genes reloj en cerebro y diferentes áreas de la periferia

como hígado, corazón, intestino y músculos en aves (Chong et al., 2003) y pulmones, corazón, hígado, músculo y testículos en reptiles (Della Ragione et al., 2005; Vallone et al., 2007).

El sistema circadiano en peces teleósteos, está formado por una red de osciladores acoplados entre los que destacan la glándula pineal, la retina y núcleos hipotalámicos (Menaker et al., 1997), si bien en estos animales existen muchos menos estudios de localización anatómica de genes reloj mediante técnicas de imagen y todos ellos están limitados al cerebro (trucha, *Oncorhynchus mykiss*, Mazurais et al., 2000; lenguado japonés, *Paralichthys olivaceus*, Watanabe et al., 2012 y pez cebra, *Danio rerio*, Moore y Whitmore, 2014; Whitmore et al., 1998), se han detectado estos genes mediante técnicas de PCR en áreas del cerebro de otros muchos teleósteos incluyendo salmón atlántico (*Salmo salar*, Davie et al., 2009), lubina (*Dicentrarchus labrax*, del Pozo et al., 2012), lenguado (*Solea senegalensis*, Martín-Robles et al., 2011; Martín-Robles et al., 2012), lábrido de tres manchas (*Halichoeres trimaculatus*, Hur et al., 2012) e incluso de carpín dorado (*Carassius auratus*, Velarde et al., 2009). Además, mediante PCR se han identificado ritmos de genes reloj en localizaciones periféricas incluyendo la hipófisis, corazón, riñón, branquias, músculos, páncreas, testículos y ovarios en pez cebra (Cermakian et al., 2000; Whitmore et al., 1998), lubina (del Pozo et al., 2012), lenguado (Martín-Robles et al., 2011; Martín-Robles et al., 2012) y carpín dorado (Nisembaum et al., 2012; Velarde et al., 2009).

La comunicación entre los osciladores centrales y periféricos, objetivo de la presente Tesis, incluye señales de tipo humoral y neuronal que en conjunto constituyen el entramado necesario para que el organismo al completo funcione de manera óptima optimizando el uso de energía.

Por ejemplo, se conoce la acción del sistema arginina-vasopresina (AVP; Kalsbeek et al., 1992), del péptido vasoactivo intestinal (VIP; Gerhold et al., 2005), la orexina (Belle et al., 2014) y la prokineticina-2 (PK2; Cheng et al., 2002) como señales utilizadas por el NSQ de mamíferos para establecer comunicación con el resto de osciladores del organismo. Por otro lado, en mamíferos se ha estudiado la acción de señales periféricas como los glucocorticoides (Albrecht, 2012; Balsalobre et al., 2000; Reddy et al., 2007; Schmutz et al., 2012; So et al., 2009; Sujino et al., 2012; Yamamoto et al., 2005) en la comunicación y coordinación de osciladores de todo el organismo. Además de la información conocida en mamíferos, en peces teleósteos se conoce la implicación de hormonas de procedencia hipotalámica como la orexina (Nisembaum et al., 2014a), y de procedencia intestinal como la ghrelina (Nisembaum et al., 2014b) si bien las señales que

comunican los osciladores están mucho menos estudiadas en los vertebrados no mamíferos.

Estos relojes periféricos, en algunos casos presentan una fase retrasada respecto a la del reloj central y además presentan ritmicidad propia. Aun así, en el caso de los mamíferos, se ha podido comprobar que estos relojes están conectados con el reloj central que los controla mediante señales de tipo hormonal como la liberación de glucocorticoides aunque también pueden sincronizarse directamente gracias a estímulos como la temperatura o la hora de alimentación.

## 2. SEÑALES SINCRONIZADORAS.

Los osciladores endógenos de los vertebrados se ven sincronizados por multitud de señales tanto externas como internas, siendo las más estudiadas los factores externos como el ciclo luz-oscuridad (Gonze y Goldbeter, 2000; Sánchez-Vázquez et al., 1995; Wright et al., 2013; Yoshida et al., 1993), la disponibilidad cíclica de alimento o la temperatura (Brown et al., 2002; Mendoza, 2007; Vallone et al., 2007) y entre los factores internos los cambios en los niveles de determinadas hormonas (Balsalobre et al., 2000; Chung et al., 2011; Nisembaum et al., 2014a; Son et al., 2011).

### 2.1. SEÑALES AMBIENTALES EXTERNAS

El ciclo luz-oscuridad es el sincronizador más importante para el NSQ que recibe esta información fótica ambiental a través del tracto retino-hipotalámico por medio de sinapsis glutamatérgicas que actúan a través de receptores NMDA y metabotrópicos presentes en el NSQ (Reppert y Weaver, 2002). En esta detección de la información lumínica interviene una subpoblación de células ganglionares de la retina que contienen melanopsina y están presentes en todos los grupos de vertebrados, entre las que se encuentran las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles de la retina (ipRGCs) (Guido et al., 2010).

El ciclo luz-oscuridad sincroniza también la actividad rítmica del propio oscilador intraocular situado en la retina neural, si bien en este caso, el mecanismo o las vías de transducción encargadas de llevar a cabo esta acción no se conocen (Iuvone et al., 2005).

Aunque es difícil pensar en una sincronización directa por el ciclo luz-oscuridad de los osciladores periféricos, si que se podría hablar de una sincronización indirecta al encontrarse estos osciladores jerárquicamente controlados por el NSQ (Albrecht, 2012; Barclay et al., 2012;



Brancaccio et al., 2014; Moore, 2013). De forma general, todos los osciladores endógenos que son sincronizados por el ciclo luz-oscuridad forman el LEO (*Light Entrainable Oscillator*).

En peces, como en el resto de los vertebrados, un gran número de ritmos biológicos son consecuencia del ciclo luz-oscuridad (Falcón et al., 2007), mostrando un ciclo de 24 horas. Por ejemplo, los ritmos de actividad locomotora van a verse sincronizados mediante este oscilador (Bayarri et al., 2004a; Hurd et al., 1998; Iigo y Tabata, 1996), así como los de temperatura y el gasto de oxígeno (Boeuf y Le Bail, 1999).

A pesar de que el ciclo luz-oscuridad es el principal sincronizador para la mayoría de los animales, no es el único. En muchas especies, la **accesibilidad periódica a la comida** o los ritmos ingesta-ayuno también ha demostrado ser un factor capaz de sincronizar diferentes variables fisiológicas y comportamentales (Madrid et al., 2001; Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001).

Esto no ha de sorprendernos, ya que el acceso a la comida es uno de los factores más relevantes que afectan a la supervivencia de los animales, por lo que éstos han desarrollado sistemas que permiten sincronizar su actividad, sus niveles hormonales y otras variables fisiológicas a las horas de alimentación garantizando de este modo un aprovechamiento máximo del alimento ingerido (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001). De este modo, conocer la hora de alimentación permite a los animales anticiparse y preparar su organismo para optimizar tanto la captura del alimento como su utilización (Sánchez-Vázquez et al., 1997).

Se ha hipotetizado con que el horario de alimentación sincroniza al FEO (*Food Entrainable Oscillator*), cuya existencia se ha sugerido a partir del proceso de anticipación al alimento mostrado por los animales, conocido como actividad anticipatoria al alimento (FAA, *Food Anticipatory Activity*) y que se define como el aumento de actividad locomotora presente en las 2-3 horas previas a la hora de administración del alimento (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001; Sánchez-Vázquez et al., 1997; Stephan, 2002). Conducta bien estudiada en los carpines, especie de estudio en la presente Tesis. Resultados de nuestro grupo de investigación han demostrado la capacidad de sincronización de los ritmos de expresión de genes reloj a un horario fijado de alimentación en el hígado, el techo óptico y el telencéfalo de animales mantenidos en condiciones de luz constante mostrando que el FEO en estos animales parece estar constituido por una red compleja de estructuras centrales y periféricas interconectadas (Feliciano et al., 2011), si bien no se ha precisado la localización anatómica responsable de su generación.

## 2.2. SEÑALES INTERNAS

Además de las señales ambientales, los diferentes osciladores endógenos también se encuentran bajo la influencia de multitud de señales internas que actúan como sincronizadores del sistema circadiano a diferentes niveles.

En este sentido, existen multitud de estudios que analizan el papel de la melatonina como modulador del funcionamiento del sistema circadiano en vertebrados. Posiblemente esta hormona sea la más estudiada en el contexto del sistema circadiano y circanual en todos los grupos de vertebrados. Sus funciones principales son la regulación de los ciclos sueño-vigilia, la hibernación, cambios estacionales y la reproducción (Arendt y Skene, 2005; Hardeland, 2008). En todos los vertebrados esta hormona está sintetizada principalmente por la glándula pineal y la retina durante la fase de oscuridad del fotociclo, mostrando un patrón rítmico diario (Falcón, 1999) tanto en especies diurnas como nocturnas e independientemente del fotoperiodo al que estén expuestos los animales (Pevet, 1998; Reiter, 1991). Las primeras aproximaciones del estudio de la melatonina como modificador del sistema circadiano demostraron que esta hormona está relacionada con los ritmos de actividad locomotora que se veían eliminados en los animales pinealectomizados (Falcón et al., 2007). En estos animales se ha podido demostrar que administraciones diarias de melatonina son capaces de sincronizar ritmos endógenos en ratones expuestos a condiciones de oscuridad constante (Armstrong et al., 1986; Redman y Armstrong, 1988). Similares resultados se han obtenido recientemente por nuestro grupo de investigación, donde hemos podido observar el papel sincronizador de la melatonina sobre ritmos de actividad locomotora y expresión de determinados genes reloj en el carpín dorado (Azpeleta, 2013). Además, la melatonina regula los niveles de glucocorticoides adrenales, actuando directamente sobre la glándula adrenal en mamíferos (Appa Rao et al., 2001) o mediante una modulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en aves y peces (Azpeleta et al., 2010; Saito et al., 2005a). Esta relación hace que se crea que ambas moléculas pueden trabajar conjuntamente para la estabilización de los ritmos circadianos.

También es muy conocido el papel de la orexina como modulador circadiano mediante la regulación del ciclo sueño-vigilia en mamíferos, manteniendo el estado de vigilia (Li et al., 2014). La primera función que se asoció con esta hormona fue la regulación de la ingesta, encontrándose dentro del grupo de las denominadas “hormonas de acción orexigénica” (Shibahara et al., 1999). Esta hormona se sintetiza principalmente en el cerebro siendo su área de mayor producción el hipotálamo en todos los grupos de vertebrados (Date et al., 1999; Domínguez et al., 2010; Kaslin et al., 2004; Shibahara et al., 1999; Singletary et al., 2006),

incluyendo el carpín dorado (Huesa et al., 2005). En el caso de los teleósteos, un estudio reciente de nuestro grupo de investigación ha puesto de manifiesto el efecto de esta hormona como sincronizadora de la FAA cuando es inyectada intraperitonealmente (IP), siendo capaz de modular niveles de ARNm de genes reloj en el hígado 1 h después y en el hipotálamo y el intestino anterior 3 h después de la inyección (Nisembaum et al., 2014a). Asimismo, se conoce que en condiciones de alimentación restringida a un horario fijo se produce un aumento de la expresión hipotalámica del ARNm de la orexina previo a la llegada del alimento (Hoskins y Volkoff, 2012; Xu y Volkoff, 2007; Yan et al., 2011)

Recientemente, se han publicado algunos estudios donde se ha analizado el papel de la **ghrelina** como sincronizador de la FAA en vertebrados incluyendo mamíferos y teleósteos (LeSauter et al., 2009; Nisembaum et al., 2014b; Yannielli et al., 2007). Si bien, no se conocen muchos detalles del mecanismo por el cual la ghrelina modula los ritmos de FAA y genes reloj.

Sin embargo, el estudio de las hormonas como moduladoras del sistema circadiano de vertebrados no mamíferos no se extiende más allá, si bien en mamíferos se está estudiando en la actualidad el efecto de otras hormonas como señales sincronizadoras de diferentes osciladores incluyendo la insulina (Tahara et al., 2011; Yamajuku et al., 2012), la leptina (Mendoza et al., 2011; Prosser y Bergeron, 2003) y la adiponectina (Hashinaga et al., 2013), no existen estudios que analicen el posible papel de estas hormonas como señales sincronizadoras de los osciladores de vertebrados no mamíferos.

En el marco de la presente Tesis hemos decidido centrar nuestra investigación en el papel de dos señales periféricas en la comunicación entre los osciladores. Para ello, hemos seleccionado dos hormonas que previamente se han asociado como posibles entradas sincronizadoras del sistema circadiano: la **ghrelina**, señal relacionada con la alimentación y el status energético del organismo y por otro lado los **glucocorticoides**, relacionados, entre otras cosas, con respuestas al estrés.

### 2.2.1. Ghrelina

La ghrelina es el único péptido orexigénico de origen gastrointestinal conocido en la actualidad, descubierto en el estómago de ratas (Kojima et al., 1999). Esta hormona presenta su máxima concentración en la parte anterior del tracto gastrointestinal de todos los vertebrados estudiados, entre los que se encuentran multitud de teleósteos (Breves et al., 2009; Kaiya et al., 2003a; Kaiya et al., 2003b; Kaiya et al., 2003c; Olsson et al., 2008; Sakata et al., 2004; Terova et al., 2008; Yeung et al., 2006), incluyendo en carpín dorado (Arcamone et

al., 2009; Kerbel y Unniappan, 2012; Miura et al., 2009; Unniappan et al., 2002), anfibios (Galas et al., 2002; Kaiya et al., 2001), reptiles (Kaiya et al., 2004) y aves (Kaiya et al., 2002; Kaiya et al., 2013b; Wada et al., 2003; Yoshimura, 2005).

Además, se han encontrado otras localizaciones donde se expresa este péptido en menores concentraciones como determinadas áreas del cerebro y algunas localizaciones periféricas como la hipófisis, placenta, linfocitos, testículo, pulmón, páncreas y riñón en mamíferos (Gualillo et al., 2001; Hattori et al., 2001; Korbonits et al., 2001; Mori et al., 2000; Tanaka et al., 2001; Tena-Sempere et al., 2002; van der Lely et al., 2004; Volante et al., 2002; Yabuki et al., 2006). En vertebrados no mamíferos se han detectado niveles de ghrelina en cerebro en anfibios (Galas et al., 2002) y aves (Kaiya et al., 2002; Kaiya et al., 2013b; Richards et al., 2006; Saito et al., 2005b). Concretamente, en teleósteos, se han visto pequeños niveles de ghrelina en hipotálamo (Jönsson, 2013; Kang et al., 2011a; Unniappan et al., 2002) y en ovario, testículo, corazón y branquias (Amole y Unniappan, 2009; Unniappan et al., 2002), así como se han detectado niveles de ghrelina plasmática de entre 4-7 fmol/ml en trucha arcoíris (Jönsson et al., 2007) hasta 140 fmol/ml en la lota (*Lota lota*, Mustonen et al., 2002), pasando por los 50 fmol/ml del carpín.

Se ha relacionado con multitud de actividades biológicas, destacando su papel en la regulación de la ingesta (Jönsson, 2013; Kang et al., 2011a; Unniappan et al., 2002; Unniappan et al., 2004), además del cual está implicada en otras actividades neuroendocrinas (Dezaki et al., 2004; Dezaki et al., 2007; Hosoda et al., 2006; Kaiya et al., 2003a; Kaiya et al., 2003b; Kojima and Kangawa, 2005; Riley et al., 2002; van der Lely et al., 2004) y las relacionadas con el funcionamiento del tracto gastrointestinal (Fujimiya et al., 2012; Kitazawa et al., 2012; Olsson et al., 2008) y más recientemente se ha relacionado con el sistema circadiano (LeSauter et al., 2009; Nisembaum et al., 2014b; Yannielli et al., 2007).

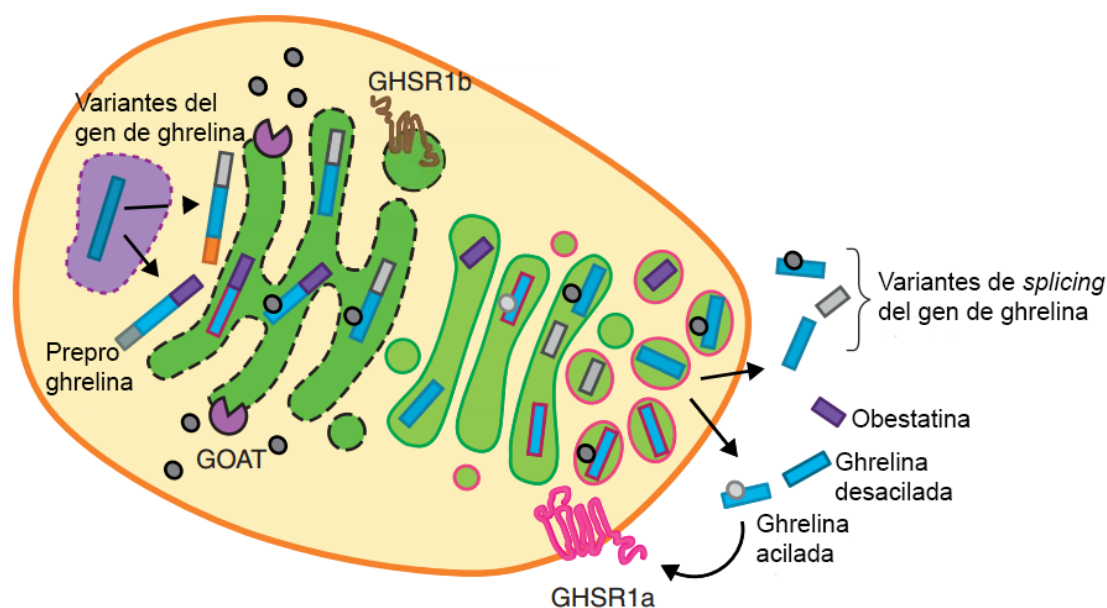
### **Formación, transporte y metabolismo de la ghrelina**

La síntesis de ghrelina sucede principalmente en el tracto gastrointestinal de los vertebrados mediante una ruptura de un prepropéptido de 117 aminoácidos denominado preproghrelina que está conservado en vertebrados (Kaiya et al., 2008; Sato et al., 2012; Seim et al., 2010).

La forma madura del péptido obtenida del procesamiento del precursor está formada por un número diferente de aminoácidos en los distintos grupos de vertebrados (figura I.4). Así, según los estudios que existen en la actualidad, se han encontrado formas de ghrelina con

27 o 28 aminoácidos en mamíferos (Kojima y Kangawa, 2005), entre 12 y 23 aminoácidos en teleósteos (Kaiya et al., 2003a; Kaiya et al., 2003b; Kaiya et al., 2003c; Kaiya et al., 2005; Miura et al., 2009; Olsson et al., 2008; Terova et al., 2008; Unniappan et al., 2002; Yeung et al., 2006), 28 en anfibios (Kaiya et al., 2001), 25 en reptiles (Kaiya et al., 2004) y 26 en aves (Kaiya et al., 2002; Kaiya et al., 2013b; Richards et al., 2006; Yoshimura, 2005).

La ghrelina madura en todos los vertebrados necesita, al menos, una modificación en la serina 3 con un ácido graso para convertirse en la forma activa (Kojima y Kangawa, 2005; Kojima et al., 1999), siendo la primera hormona conocida modificada por un ácido graso. Esta modificación consiste, por regla general, en la adición de un grupo octanoil (C8:0) (Nishi et al., 2011) mediante la acción de la enzima ghrelina-O-acil-transferasa o GOAT antes de la translocación de la proteína en formación al aparato de Golgi (Gutiérrez et al., 2008; Yang et al., 2008). De hecho, esta ghrelina octanoilada fue la inicialmente descubierta por Kojima et al. (1999), siendo la forma capaz de unirse a los receptores tipo GHS-R1a.



**Figura I.4. Ejemplo de esquema de procesamiento de la ghrelina en humanos.** El procesamiento del péptido en vertebrados es equivalente variando el número de exones que presenta el gen en cada grupo de animales. El gen de la preproghrelina se traduce y en el retículo endoplásmico se acila como consecuencia de la acción de la ghrelina-O-aciltransferasa (GOAT). A continuación en el aparato de Golgi se escinde en obestatina (sólo mamíferos) y ghrelina que son liberadas al exterior celular por exocitosis. Traducido de Gahete et al. (2014).

Por otro lado, existen variaciones en el ácido graso que se integra en la molécula que rinden igualmente una proteína activa, como es el caso de la adición de cadenas decanoil (C10:0) o decenoil (C10:1) (Ida et al., 2007; Ida, 2012; Nishi et al., 2011). Además, existen

diversos estudios que demuestran que, en algunos casos, la ghrelina desacilada, presente igualmente en el tracto gastrointestinal de los vertebrados, puede presentar actividad biológica como inhibidora de la acción de la ghrelina acilada sobre la ingesta (Asakawa et al., 2005; Gauna et al., 2005; Matsuda et al., 2006; Toshinai et al., 2006). Si bien estos efectos no serán mediados por los receptores GHS-R que son insensibles a esta forma de ghrelina (Kojima et al., 1999), podrían ser mediados por otros tipos de receptores desconocidos por el momento (Gauna et al., 2005; Kirchner et al., 2009).

La ghrelina se libera al torrente sanguíneo desde las células de la mucosa gastrointestinal P/D1 donde se sintetiza mayoritariamente y una vez en la sangre, se transporta principalmente unida a proteínas transportadoras grandes como las lipoproteínas a las que se une a través del grupo acilado (De Vriese et al., 2007; Holmes et al., 2009; Satou et al., 2011), si bien existe una pequeña fracción del péptido que puede aparecer en forma libre en el plasma (Holmes et al., 2009; Satou et al., 2011).

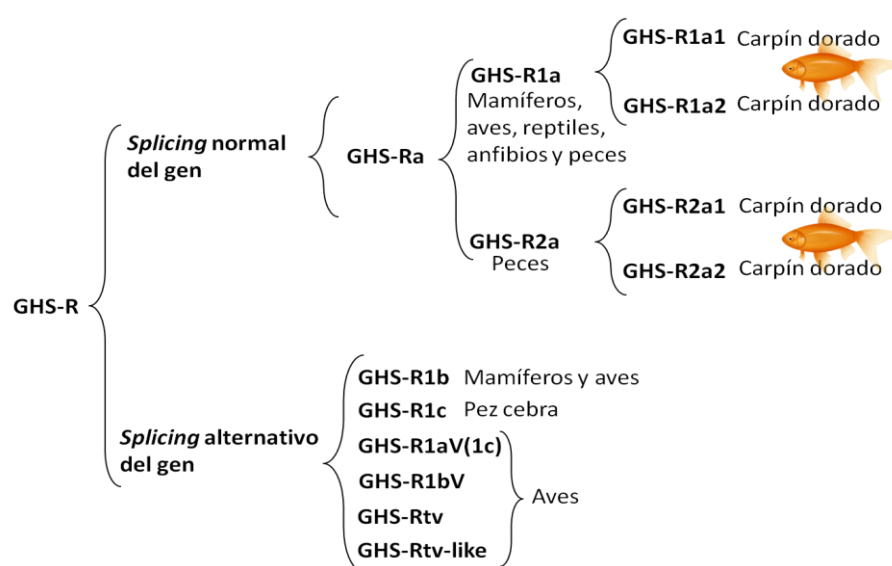
La degradación de la ghrelina comienza por la acción de determinadas carboxil-esterasas que liberan la cadena lipídica unida a la serina 3 inactivando el péptido seguida de la acción de aminopeptidasas que degradan el péptido (De Vriese et al., 2004). Estas enzimas pueden encontrarse a nivel plasmático, en el hígado, el estómago y el riñón (De Vriese et al., 2004). Concretamente, el hígado y el riñón parecen tener un papel especialmente relevante en la degradación de la ghrelina ya que un fallo en su metabolismo en estos tejidos se ha relacionado con determinadas patologías (Wu et al., 2003; Yoshimoto et al., 2002).

### **Receptores de ghrelina**

Los receptores de ghrelina fueron descubiertos por primera vez por Howard et al. (1996) en hipotálamo e hipófisis de humanos y cerdos. Estos receptores forman parte de la familia de receptores acoplados a proteínas G con 7 segmentos transmembrana (Howard et al., 1996). Howard y su equipo describieron la existencia de dos variantes de *splicing* de las cuales solamente una GHS-R1a era capaz de provocar un incremento de calcio intracelular como respuesta a la unión de la ghrelina acilada, mientras que la otra, GHS-R1b, tiene diversas funciones no relacionadas con la señalización por ghrelina, molécula que no reconoce (Kaiya et al., 2013a), entre las que destaca la reducción de la capacidad de señalización de los receptores GHS-R1a por heterodimerización (Chow et al., 2012; Leung et al., 2007).

Los receptores de ghrelina en vertebrados no mamíferos se encuentran igualmente divididos en dos tipos según la variante de *splicing* que sean, bien la variante que produce una

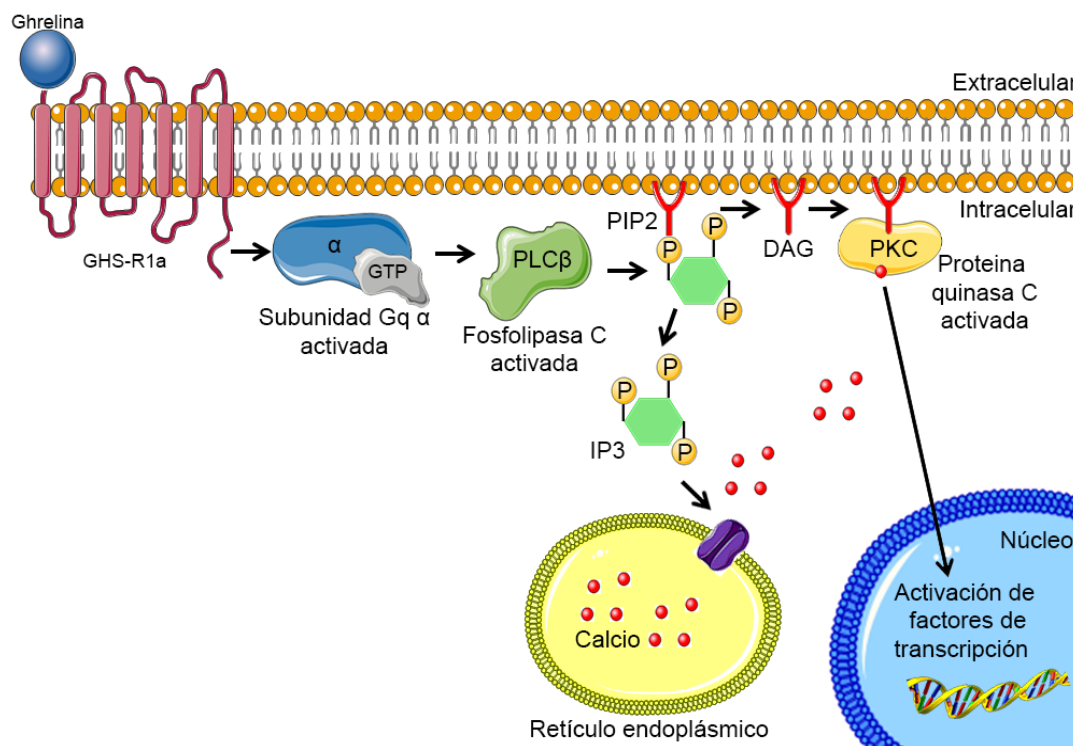
forma activa del receptor, equivalente a la forma GHS-R1a de mamíferos o bien la variante que produce un receptor que no responde a ghrelina como la forma GHS-R1b de mamíferos (Kitazawa et al., 2009). Concretamente en peces cipriniformes como el carpín dorado y el pez cebra se ha descrito también un gen parálogo de GHS-R1a, denominado GHS-R2a cuya existencia puede ser consecuencia de la duplicación genómica sucedida en el linaje de los peces teleósteos (Braasch y Postlethwait, 2012; Kaiya et al., 2013a). Asimismo, el carpín dorado tiene dos genes parálogos para las formas GHS-R1a (GHS-R1a1 y GHS-R1a2) y GHS-R2a (GHS-R2a1 y GHS-R2a2), debido al origen tetraploide de la subfamilia *Cyprininae*, contando con un total de cuatro genes diferentes de receptores activos de ghrelina (Kaiya et al., 2010, figura I.5).



**Figura I.5. Clasificación de los receptores de ghrelina.** Modificado de (Kaiya et al., 2013a), añadiendo información de Eom et al. (2014) y Kaiya et al. (2010).

Los receptores de ghrelina GHS-R1a se encuentran ampliamente distribuidos en vertebrados destacando su presencia en hipotálamo y algunas localizaciones periféricas como la hipófisis, el corazón, la glándula tiroidea, el corazón, el pulmón, el hígado, los riñones, el páncreas y el sistema gastrointestinal (Chan y Cheng, 2004; Chen et al., 2009; Geelissen et al., 2003; Gnanapavan et al., 2002; Guan et al., 1997; Kaiya et al., 2009a; Kaiya et al., 2009b; Kaiya et al., 2010; Nie et al., 2009; Small et al., 2009; Zigman et al., 2006). Por su parte, el receptor GHS-R1b presenta una distribución menos localizada en mamíferos con su máxima expresión en la piel, corazón e hipófisis (Gnanapavan et al., 2002), mientras que en vertebrados no mamíferos se ha detectado en peces en cerebro, hipófisis, tracto gastrointestinal, tejido adiposo, branquias, hígado, riñones y músculo (Chen et al., 2008; Kaiya et al., 2009a; Kaiya et al., 2009b; Small et al., 2009).

De todos los receptores de ghrelina, el más estudiado es el GHS-R1a. La principal vía de señalización de estos receptores está bastante conservada en los vertebrados y se basa en la activación de la cascada de señalización dependiente de proteína quinasa C (PKC) activada por acción de la fosfolipasa C (Kojima et al., 1999; Yin et al., 2014, figura I.6). De hecho, numerosos estudios describen una actividad constitutiva del receptor GHS-R1a a través de la activación basal de esta vía de señalización (Damian et al., 2012; Holliday et al., 2007; Holst y Schwartz, 2004; Holst et al., 2003; Holst et al., 2004).



**Figura I.6. Cascada de señalización principal desencadenada por la activación del receptor de ghrelina GHS-R1a según (Yin et al., 2014).** La activación de la ghrelina tiene como consecuencia la activación de la vía de señalización de la PLC-PKC, encargada de modular determinados factores de transcripción.

Estudios recientes han demostrado que en determinados casos, el receptor GHS-R1a es capaz de activar diferentes cascadas de señalización además de la vía de la proteína quinasa C (figura 6, Yin et al., 2014, tabla 1). Así, en neuronas que contienen el neuropéptido Y (NPY) la activación de GHS-R1a producirá un incremento de calcio intracelular vía AMP cíclico- proteína quinasa A, PKA (Kohn et al., 2003). Por otro lado, en tejidos periféricos, la activación de GHS-R1a dispara la vía AMP quinasa (AMPK) con el fin de regular la distribución de las grasas de manera dependiente de tejido (Barazzoni et al., 2005). Esta vía es utilizada también en el hipotálamo para la regulación de la tasa de disparo de las neuronas NPY/AgRP (*Agouti Related Protein*, Andrews et al., 2008) y en las neuronas dopaminérgicas como protectora frente a la enfermedad de Parkinson (Bayliss y Andrews, 2013). En diversas localizaciones centrales



críticas para el metabolismo como el hipotálamo y el núcleo vagal, puede actuar a través de la vía mTOR, si bien es cierto que los efectos de la ghrelina por esta vía están todavía en estudio, aunque se postula la posible interacción entre las vías mTOR y AMPK (Stevanovic et al., 2012). Además, la activación de este receptor puede conllevar la activación de la vía del receptor sustrato de insulina (IRS-1) asociado a la vía de la fosfatidil inositol 3 quinasa PI3K- akt inhibiendo la apoptosis (Xiang et al., 2011). Por último se ha detectado que la señal vía GHS-R1a puede transmitirse mediante la activación de la MAP quinasa (MAPK) principalmente en células adrenales donde su activación tiene efectos antiapoptóticos (Mazzocchi et al., 2004).

**Tabla 1. Resumen de vías de señalización que pueden activarse vía GHS-R1a, exceptuando la vía principal descrita en la figura 6.**

Vía modulada	Localización	Modelo experimental	Efecto	Bibliografía
AMPC-PKA	Neuronas NPYérgicas	Ratas	Aumento de calcio que se ve favorecido por orexina en las mismas neuronas e inhibido por leptina	Kohno et al., 2003
AMPK	Hipotálamo (neuronas NPY/AgRP)	Ratones	Regula la tasa de disparo de dichas neuronas	Andrews et al., 2008
	Neuronas dopaminérgicas	Mamíferos	Prevención enfermedad de Parkinson	Bayliss y Andrews, 2013
	Hígado	Ratas	Inhibición de AMPK para aumentar el contenido de triglicéridos	Barazzoni et al., 2005
	Hipotálamo y núcleo vagal	Ratas	Inactivación de la vía mTOR	Stevanovic et al., 2012
PI3K	Células endoteliales	Humanos	Inhibición de apoptosis	Xiang et al., 2011
MAPK	Células adrenales	Humanos	Inhibición de apoptosis	<u>Mazzocchi et al., 2004</u>

Los receptores de ghrelina están regulados tanto por diversos factores de transcripción, sobre todo en la hipófisis de mamíferos (Kineman et al., 1999; Petersenn et al., 2001; Yan et al., 2004), como por determinadas hormonas como el estradiol y la triiodotironina que actúan incrementando los niveles de GHS-R1a en la hipófisis (Kamegai et al., 2001; Petersenn et al., 2001) o la hormona del crecimiento que los incrementan en varios núcleos hipotalámicos (Bennett et al., 1997) y el cortisol que los disminuye (Kaji et al., 2001).

Asimismo, estos receptores sufren desensibilización mediante su internalización en la

célula cuando está unido a la ghrelina durante un tiempo superior a los 20 minutos según estudios de cinética y estudios funcionales sobre el efecto de pulsos de ghrelina separados en el tiempo en la ingesta (Camiña et al., 2004; Tolle et al., 2001).

### **Regulación de la secreción**

El principal factor regulador de la secreción de ghrelina es la alimentación. Esta hormona se secreta en anticipación a la llegada del alimento (LeSauter et al., 2009). Además, se observa un aumento de los niveles circulantes del péptido en condiciones de ayuno que disminuyen tras la alimentación (Cummings et al., 2001; Kirchner et al., 2009; Unniappan et al., 2004). Sin embargo, en la actualidad, los factores humorales o neurales responsables de la regulación de esta hormona son poco conocidos, siendo el candidato más probable la glucemia, ya que, al aumentar la glucosa plasmática se disminuyen los niveles de ghrelina (Shiia et al., 2002), como sucede durante el periodo nivel postprandial (Overduin et al., 2005). De hecho, el descenso de ghrelina en este momento es proporcional a la cantidad de calorías ingeridas, indicando el papel de los macronutrientes de la dieta como reguladores de los niveles de ghrelina (Overduin et al., 2005). Asimismo, la expresión de ghrelina puede estar estimulada por un descenso de glucosa debido a la acción de la insulina (Saad et al., 2002) o por la administración de leptina (Toshinai et al., 2001). Por su parte, la insulina, además, es capaz de inhibir el efecto de la ghrelina sobre la ingesta a través de receptores específicos de insulina localizados en las neuronas NPY/AgRP del núcleo arqueado de mamíferos (Maejima et al., 2011), principal área de acción de la ghrelina, como se detallará en el apartado siguiente. Igualmente, la leptina es capaz de inhibir la acción de la ghrelina al mismo nivel que la insulina vía PI3K (Kohno et al., 2007). Asimismo, tanto la somatostatina como la hormona del crecimiento disminuyen la concentración plasmática de ghrelina en mamíferos (Broglia et al., 2002; Qi et al., 2003).

Si bien en la regulación de los niveles plasmáticos de ghrelina es especialmente relevante el metabolismo de la glucosa y la acción de hormonas relacionadas con éste, no es el único mecanismo de regulación que modula la presencia o ausencia de la ghrelina en sangre. Así, otras hormonas que no están directamente relacionadas con la glucosa como es el caso de la melatonina o la hormona tiroidea actúan disminuyendo la concentración plasmática de ghrelina en mamíferos (Mustonen et al., 2001; Riis et al., 2003).

Además, aparte de la acción de diferentes sistemas hormonales, existen igualmente

señales de tipo neural que van a regular los niveles circulantes de ghrelina en mamíferos, conociéndose la participación de los sistemas adrenérgicos y colinérgicos. En este sentido, en ratas tratadas con agonistas de receptores muscarínicos y de receptores  $\beta$ -adrenérgicos o con antagonistas de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos se observa un incremento de los niveles de acil-ghrelina circulantes (Hosoda y Kangawa, 2008). Por el contrario, estos niveles se ven disminuidos en animales tratados con antagonistas de receptores muscarínicos y agonistas de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Hosoda y Kangawa, 2008).

### **Acciones biológicas**

La ghrelina es una hormona que tiene multitud de acciones fisiológicas tanto a nivel central como periférico (figura I.7). Principalmente, es una hormona de acción orexigénica que actúa como señal de hambre y promueve el inicio de la alimentación.

La ghrelina es un factor estimulador del apetito tanto en localizaciones centrales, como con respecto a la motilidad intestinal en los vertebrados estudiados hasta el momento (Kaiya et al., 2006; Matsuda et al., 2006; Unniappan et al., 2002; Unniappan et al., 2004), exceptuando las aves (Furuse et al., 2001; Geelissen et al., 2003; Saito et al., 2005b). Para llevar a cabo esta función actúa principalmente sobre el núcleo arqueado en mamíferos (Kojima y Kangawa, 2005). Este núcleo hipotalámico es una de las localizaciones más relevantes en la regulación de la ingesta, siendo a su vez objetivo de numerosos factores tanto orexigénicos (NPY y AgRP; Morton y Schwartz, 2001) como anorexigénicos (leptina, Kohno et al., 2007; Perello et al., 2012). La ghrelina actúa a este nivel activando las neuronas NPY/AgRP, mediante un incremento de los niveles de NPY y AgRP (Andrews et al., 2008; Briggs y Andrews, 2011; Currie et al., 2005; Funahashi et al., 2003; Gil-Campos et al., 2006; Goto et al., 2006; Kageyama et al., 2010; Kageyama et al., 2012; Kohno y Yada, 2012; Kohno et al., 2003; Seoane et al., 2003; van den Top et al., 2004; Wang et al., 2014) donde se ha descrito la presencia de receptores GHS-R1a (Mondal et al., 2005; Willeesen et al., 1999). Además, se han descrito conexiones directas entre las fibras ghrelinérgicas y las neuronas NPY/AgRP del núcleo arqueado (Cowley et al., 2003).

La ghrelina también actúa sobre los centros de recompensa mesolímbicos (Abizaid et al., 2006; Naleid et al., 2005; Toshinai et al., 2006) y también estimula el apetito vía activación de otro péptido orexigénico hipotalámico, la orexina. En este sentido, se ha descrito que existe una relación anatómica entre los terminales axonales que presentan ghrelina con las neuronas productoras de orexina en mamíferos (Toshinai et al., 2003), de tal manera que el efecto orexigénico de la ghrelina parece estar mediado vía orexina, hecho que se demuestra en

ratones *knockout* para la orexina, donde la respuesta a ghrelina está atenuada (Toshinai et al., 2003).

Un efecto similar se ha descrito en teleósteos, concretamente en carpín, donde una inyección intracerebroventricular de ghrelina indujo la ingesta a través de su acción sobre el NPY y la orexina (Miura et al., 2006; Miura et al., 2007). Asimismo, un tratamiento periférico con inyecciones intraperitoneales de ghrelina es también capaz de regular la ingesta en mamíferos y teleósteos (Date et al., 2002; Matsuda et al., 2006; Rüter et al., 2003; Shepherd et al., 2007; Unniappan et al., 2004; Wang et al., 2002), mecanismo que parece estar mediado en ambos grupos por el nervio vago vía núcleo arqueado (Date et al., 2002; Guan et al., 2010; Matsuda et al., 2006).

A nivel periférico, la ghrelina también está relacionada con la regulación de la motilidad intestinal, promoviendo el vaciado intestinal en teleósteos, aves y mamíferos (Fujimiya et al., 2012; Kitazawa et al., 2007; Olsson et al., 2008), si bien, en vertebrados no mamíferos existe cierta controversia con respecto a este papel de la ghrelina, existiendo determinados estudios en los que se utilizan moléculas homólogas a esta hormona que muestran que no parece tener efecto sobre la motilidad intestinal (Kitazawa et al., 2012). Además, la ghrelina regula la secreción de enzimas gástricas (Warzecha et al., 2006) y pancreáticas (Kapica et al., 2006) en mamíferos.

Existe una estrecha relación entre los niveles de glucosa en sangre y los de ghrelina. En este sentido, como se comentó en el apartado anterior, la glucosa es el factor más estudiado como regulador de los niveles plasmáticos de ghrelina (Overduin et al., 2005; Shiiya et al., 2002). Sin embargo, esta relación es bidireccional. Esto implica que la ghrelina es también responsable, al menos parcialmente, de la regulación de la glucemia. Actualmente, se ha demostrado el papel de la ghrelina en la regulación del metabolismo de la glucosa a través de su acción sobre la secreción de insulina en mamíferos. La ghrelina actúa inhibiendo la secreción de esta hormona (Dezaki et al., 2004; Dezaki et al., 2007), promoviendo una hiperglucemia (Arosio et al., 2003; Cui et al., 2008; Wang et al., 2010). Esta inhibición de la insulina por parte de la ghrelina puede observarse igualmente en teleósteos (Cruz et al., 2010). En humanos se ha descrito que ambas hormonas, ghrelina e insulina, presentan perfiles de expresión opuestos, siendo el máximo de la ghrelina antes de la hora de la alimentación coincidiendo con los valores más bajos de concentración de insulina, perfiles que se invierten tras la ingesta de alimentos (Cummings et al., 2001). Por otro lado, la ghrelina es capaz de inhibir directamente las neuronas hipotalámicas sensibles a glucosa en mamíferos (Chen et al.,

2005).

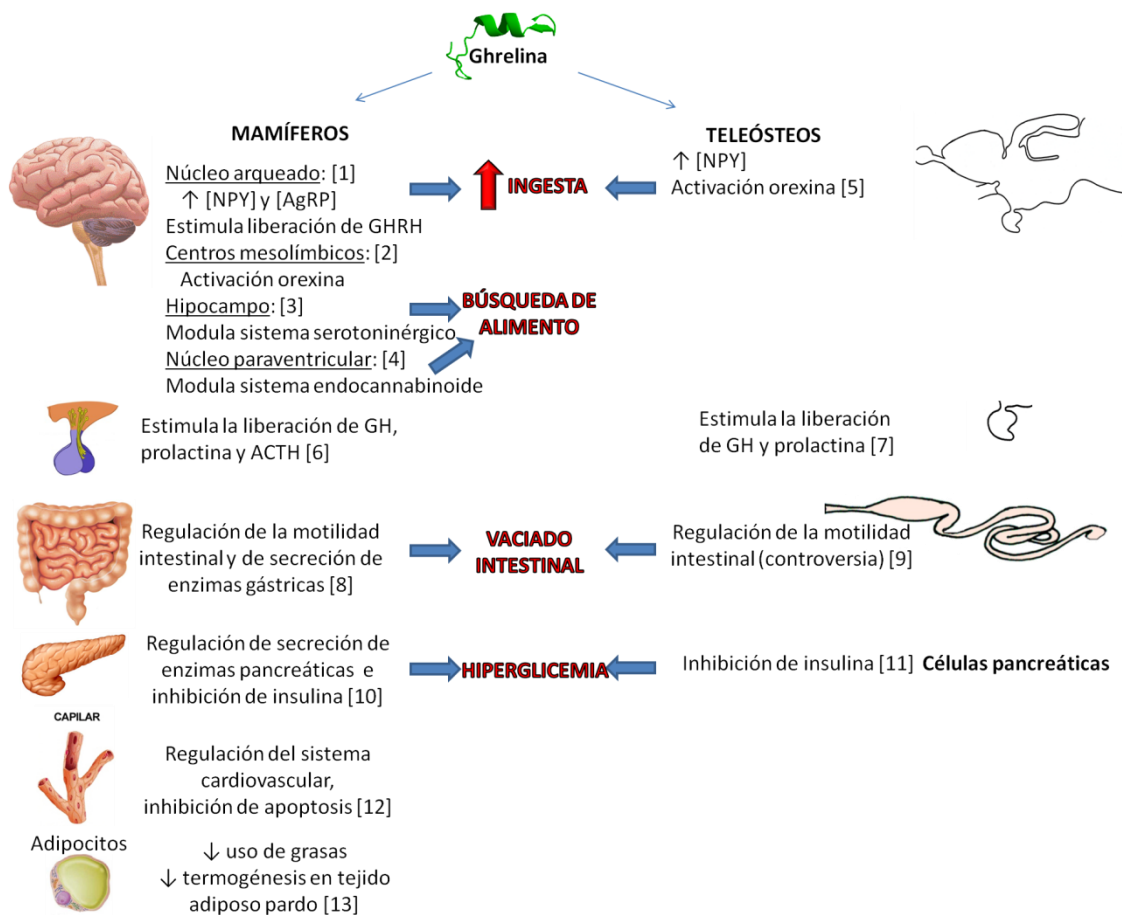
Con respecto al comportamiento de búsqueda de alimento e inicio de la ingesta relacionado con la acción de la ghrelina, se ha visto que esta hormona es un factor modulador del sistema serotoninérgico en mamíferos, que se ha descrito como regulador de este comportamiento en el hipocampo (Carlini et al., 2007). Así, el papel de la ghrelina sobre la ingesta a este nivel parece ser dependiente de la disponibilidad de serotonina ya que un tratamiento con un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina disminuye los efectos de la ghrelina sobre la ingesta en mamíferos (Carlini et al., 2007). En el núcleo paraventricular, el sistema endocannabinoide es uno de los moduladores de la ingesta que se ve modificado por acción de la ghrelina en mamíferos (Kola et al., 2008; van Thuijl et al., 2008).

Además de su acción directamente relacionada con la ingesta, la ghrelina actúa estimulando la liberación de diversas hormonas. Entre ellas, la que inicialmente se relacionó con la ghrelina fue la hormona del crecimiento (GH; Hosoda et al., 2006; Kaiya et al., 2003a; Kaiya et al., 2003b; Kojima y Kangawa, 2005; van der Lely et al., 2004). En la hipófisis la ghrelina actúa a través de sus receptores para estimular la liberación tanto de ésta hormona de manera dosis-dependiente en mamíferos en experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* (Asakawa et al., 2001a; Date et al., 2000; Kojima et al., 1999; Wren et al., 2000), como de la prolactina (Benso et al., 2013; Lanfranco et al., 2010; Riley et al., 2002). Asimismo, se ha demostrado el mismo papel de la ghrelina en estudios realizados en vertebrados no mamíferos. En teleósteos, la ghrelina actúa directamente sobre la hipófisis para estimular la liberación de GH y prolactina (Chan y Cheng, 2004; Chan et al., 2004; Kaiya et al., 2003a; Kaiya et al., 2003b; Kaiya et al., 2003c; Shepherd et al., 2007; Unniappan y Peter, 2004). En anfibios, la ghrelina tiene un efecto directo, y también indirecto mediado por el nervio vago, sobre la estimulación de células somatotropas y lactotropas (Kaiya et al., 2001). En aves, la ghrelina estimula la liberación de GH tanto *in vitro* como *in vivo* (Baudet y Harvey, 2003). Además del papel de la ghrelina como estimulador de GH a nivel hipofisario, se han encontrado evidencias que demuestran que puede actuar también a nivel hipotalámico, concretamente en neuronas GHRH del núcleo arqueado (Briggs y Andrews, 2011). Asimismo se ha demostrado un efecto débil de la ghrelina como factor estimulador de hormona adrenocorticotropa (ACTH) y cortisol (Nagaya et al., 2001; Takaya et al., 2000).

Inyecciones repetidas de acil-ghrelina en roedores provocan un aumento de peso en los animales al mismo tiempo que disminuyen el uso de las grasas (Tschöp et al., 2000), el descenso del consumo de oxígeno (Asakawa et al., 2001a) y la disminución de la termogénesis

del tejido adiposo pardo (Yasuda et al., 2003), siendo estos efectos independientes de la acción orexigénica de la hormona.

Por último, se ha descrito que la ghrelina está implicada igualmente en la regulación del sistema cardiovascular (Kleinz et al., 2006; Wiley y Davenport, 2002), la inhibición de la apoptosis y la diferenciación de osteoblastos (Kim et al., 2005).



**Figura 7. Resumen de las acciones biológicas principales de la ghrelina en mamíferos y teleósteos.**

Esquema realizado aunando las diferentes acciones realizadas por la ghrelina presentes en la bibliografía. [1] Andrews et al., 2008; Briggs y Andrews, 2011; Currie et al., 2005; Funahashi et al., 2003; Gil-Campos et al., 2006; Goto et al., 2006; Kageyama et al., 2010; Kageyama et al., 2012; Kohno y Yada, 2012; Kohno et al., 2003; Seoane et al., 2003; van den Top et al., 2004; Wang et al., 2014 [2] Abizaid et al., 2006; Naleid et al., 2005; Toshinai et al., 2003; Toshinai et al., 2006. [3] Carlini et al., 2007. [4] Kola et al., 2008; van Thuijl et al., 2008. [5] Date et al., 2002; Kojima et al., 1999; Matsuda et al., 2006; Miura et al., 2006; Miura et al., 2007; Rüter et al., 2003; Shepherd et al., 2007; Unniappan et al., 2004; Wang et al., 2002. [6] Asakawa et al., 2001a; Benso et al., 2013; Date et al., 2000; Kojima et al., 1999; Lanfranco et al., 2010; Riley et al., 2002; Wren et al., 2000. [7] Chan y Cheng, 2004; Chan et al., 2004; Kaiya et al., 2003a; Kaiya et al., 2003b; Kaiya et al., 2003c; Shepherd et al., 2007; Unniappan y Peter, 2004. [8] Fujimiya et al., 2012. [9] Kitazawa et al., 2012; Olsson et al., 2008. [10] Dezaki et al., 2004; Dezaki et al., 2007. [11] Cruz et al., 2010. [12] Kleinz et al., 2006; Wiley y Davenport, 2002. [13] Tschöp et al., 2000; Yasuda et al., 2003.

### **Ghrelina y sistema circadiano**

En los diferentes grupos de vertebrados, desde teleósteos hasta mamíferos, se han podido detectar niveles de ghrelina en localizaciones encefálicas y periféricas (Amole y Unniappan, 2009; Gualillo et al., 2001; Hattori et al., 2001; Jönsson, 2013; Kaiya et al., 2002; Kaiya et al., 2010; Kaiya et al., 2013b; Korbonits et al., 2001; Mori et al., 2000; Richards et al., 2006; Saito et al., 2005b; Tanaka et al., 2001; Tena-Sempere et al., 2002; Unniappan et al., 2002; van der Lely et al., 2004; Volante et al., 2002; Yabuki et al., 2006) que previamente se han relacionado con el sistema circadiano como el hipotálamo y el hígado entre otras (Albrecht, 2012; Feliciano et al., 2011; Hastings et al., 2007; Hastings et al., 2008; Kalsbeek et al., 2012; Kitchener et al., 2004; Nader et al., 2010; Nicolaidis et al., 2014; Ota et al., 2012; Reppert and Weaver, 2002; Velarde et al., 2009).

La ghrelina puede actuar como señal del sistema circadiano gracias a que es capaz de afectar directamente a los genes reloj del NSQ de mamíferos (Yannielli et al., 2007). Además, estudios recientes en algunos vertebrados incluyendo el carpín dorado, objeto de la presente Tesis, han demostrado el efecto de la ghrelina como facilitadora de la generación de la actividad anticipatoria al alimento y modificadora de la expresión de determinados genes reloj (LeSauter et al., 2009; Nisembaum et al., 2014b; Yannielli et al., 2007).

Concretamente en este teleósteo, una inyección aguda de ghrelina es capaz de inducir la expresión de los genes *gper1a* y *gper3* una hora después del tratamiento (Nisembaum et al., 2014a), apoyando el papel de la ghrelina como señal de entrada del sistema circadiano en estos animales llevándonos a plantearla como candidata para ser considerada una señal que comunica los diferentes osciladores que componen el sistema circadiano en los peces teleósteos.

### **2.2.2. Glucocorticoides**

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas secretadas por la glándula adrenal, específicamente por las células esteroideogénicas que constituyen el sistema de respuesta al estrés. Estímulos amenazadores medioambientales generan un incremento de los niveles circulantes de glucocorticoides mediante la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Los glucocorticoides interactúan con receptores intracelulares en las células diana y, entonces, regulan diversos procesos fisiológicos relacionados principalmente con metabolismo y la respuesta al estrés, entre otros (Aluru y Vijayan, 2009; Dickmeis, 2009).

### **Formación, transporte y metabolismo de glucocorticoides**

La síntesis de glucocorticoides se inicia mediante la activación por parte de la ACTH de los receptores de melanocortina tipo 2 (MC2R) acoplados a proteínas G (Dores y Liang, 2014; Veo et al., 2011).

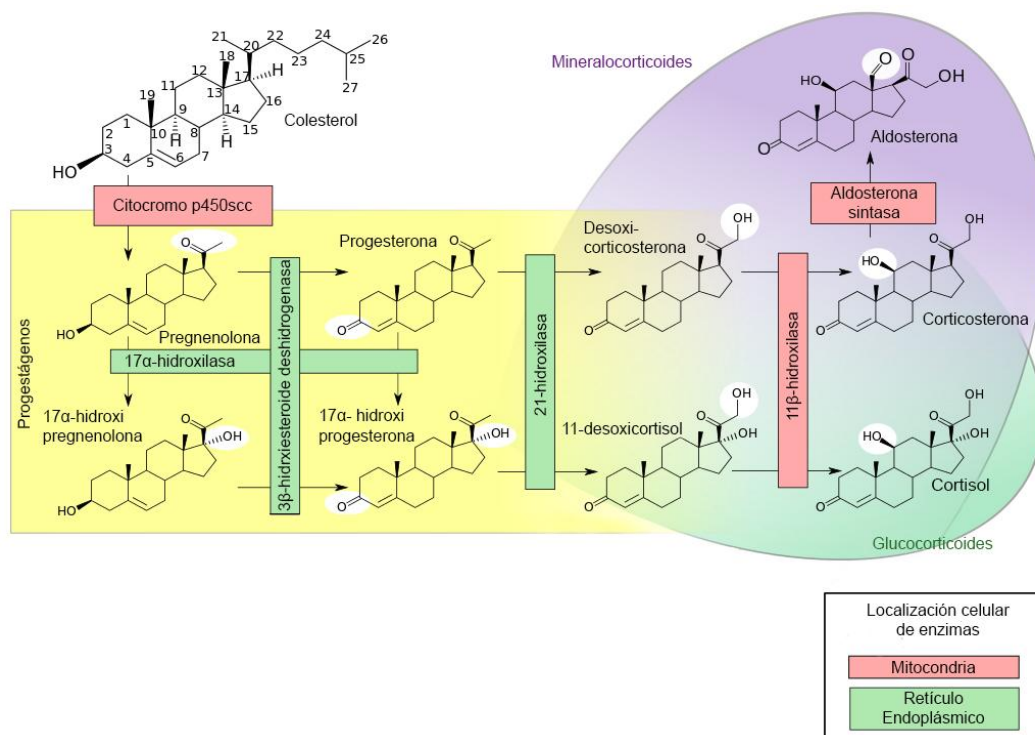
Los precursores de los glucocorticoides son los ésteres de colesterol que pueden ser captados de la circulación o sintetizados *de novo* por las células a partir de acetato (figura 1.8). En la circulación, el colesterol no esterificado circula unido a las lipoproteínas sanguíneas que se captan gracias a receptores para las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y receptores de Scavenger clase B, tipo I (conocidos como SR-BI) que tienen las células esteroideogénicas principalmente localizadas en la adrenal de mamíferos (Azhar et al., 2003). En el caso de los teleósteos, las células esteroideogénicas, denominadas células interrenales, se distribuyen por la región conocida como “cabeza del riñón” o riñón cefálico, que se encuentra cerca de las células cromafines facilitando un posible control paracrino de la liberación de estas hormonas (Mommensen et al., 1999; Reid et al., 1996).

En el interior de estas células, los ésteres de colesterol se almacenan en forma de gotas lipídicas que son diana de lipasas que rompen el enlace éster y liberan colesterol al citoplasma (Sewer y Waterman, 2003). Una vez libre, será transportado por diversas proteínas, entre las que se encuentra la proteína StAR, hasta la membrana interna mitocondrial (Lin et al., 1995; Sewer et al., 2007; Stocco, 2000a; Stocco, 2000b). Aquí, la enzima citocromo P450<sub>sc</sub> escinde los seis carbonos terminales de la cadena lateral del colesterol, generando pregnenolona (Strushkevich et al., 2011), que abandona la mitocondria y se transforma en progesterona en el retículo endoplásmico por acción de la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. A continuación, mediante hidroxilaciones adicionales dependientes de NADP producen metabolitos intermediarios que finalmente rinden los esteroides adrenales característicos de cada especie. En el caso del cortisol, principal glucocorticoide en teleósteos, es la enzima 11 $\beta$ -hidroxilasa la encargada de realizar la última transformación que sucede en la mitocondria (Alsop y Vijayan, 2009; Payne y Hales, 2004; Sewer et al., 2007).

Como toda molécula esteroide, los glucocorticoides son lipófilos e hidrófobos siendo transportados en sangre mayoritariamente unidos a proteínas transportadoras principalmente la transcortina o globulina fijadora de corticosteroides y, en menor proporción, una  $\alpha$ -2globulina y seroalbúmina, en forma biológicamente inactiva (Henley y Lightman, 2011; Lin et al., 2010; Perogamvros et al., 2012). Este cortisol plasmático es una reserva que puede disociarse rápidamente de sus proteínas transportadoras quedando como cortisol libre



(Hadley, 1997). Esta pequeña fracción de cortisol libre (aproximadamente el 6% del cortisol total) puede viajar libremente siendo biológicamente activo.



**Figura I.8. Enzimas, su localización celular, sustratos y productos en la esteroidogénesis.** Los círculos blancos indican los cambios en la estructura molecular comparada con sus precursores. Modificado de (Richfield y Häggström, 2014).

Los glucocorticoides son catabolizados principalmente en el hígado donde entran mediante difusión pasiva o con ayuda de una proteína transportadora de baja afinidad (Alléra y Wildt, 1992; Vijayan et al., 1997), aunque también puede metabolizarse en el riñón y en los órganos diana. Inicialmente, se producen una serie de reducciones que los transforman en tetrahydroconjugados (Ackermann et al., 1999; McNeilly et al., 2010; Truscott, 1979). A continuación, se esterifican con sulfatos y/o se conjugan con ácido glucorónico para transformarse en compuestos hidrosolubles que no son reconocidos por las proteínas transportadoras plasmáticas y que se eliminan por la bilis (Idler y Truscott, 1972; Vijayan y Leatherland, 1990), la orina (Idler y Truscott, 1972) y, en el caso de los teleósteos también por las branquias (Cravedi et al., 1993).

### Receptores de glucocorticoides

Como se comentó previamente, los glucocorticoides secretados van a atravesar las membranas celulares bien mediante un mecanismo de difusión pasiva, bien mediante la ayuda de una proteína transportadora de baja afinidad (Alléra y Wildt, 1992; Vijayan et al., 1997) y van a unirse a receptores intracelulares específicos, controlando de esta manera multitud de

procesos fisiológicos que van a permitir al organismo resistir a las situaciones de estrés.

En anfibios, reptiles y mamíferos se conoce la existencia de dos tipos de receptores a los que se pueden unir los glucocorticoides, el receptor tipo I (receptor de mineralocorticoides, MR) y el receptor tipo II (receptor de glucocorticoides, GR), ambos miembros de la familia de receptores nucleares (Mangelsdorf et al., 1995; Mehi et al., 1987; Robinson-Rechavi et al., 2003). En teleósteos existen al menos dos genes del GR (GR1 y GR2), como resultado de su duplicación genómica (Bury et al., 2003; Jaillon et al., 2004), postulándose que su existencia puede ser la responsable de una mayor plasticidad en la respuesta al estrés en estos animales (Bury y Sturm, 2007).

Estos receptores en ausencia de esteroides se encuentran secuestrados por un conjunto de chaperonas, incluyendo las proteínas de choque térmico, HSP-90 (Pratt, 1997). Al llegar los glucocorticoides, se produce un cambio conformacional en el receptor que hace que se disocie el complejo chaperonas-receptor para permitir la formación del complejo receptor-ligando y así activarse (Nicolaidis et al., 2010). Una vez formado este complejo, se dimeriza y transloca al núcleo para ejercer su acción como factor de transcripción modulando diversos genes vía activación o inhibición de la transcripción (Nader et al., 2010; Nicolaidis et al., 2010). Alternativamente, en lugar de formar homodímeros, el complejo receptor-glucocorticoide puede asociarse con otros factores de transcripción como NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y STAT5 (proteína transductora de señal y activadora de la transcripción) y modificar el efecto de éstos sobre sus genes dianas (Chrousos y Kino, 2005; Nicolaidis et al., 2010; Nicolaidis et al., 2014). Esto último se denomina transrepresión génica.

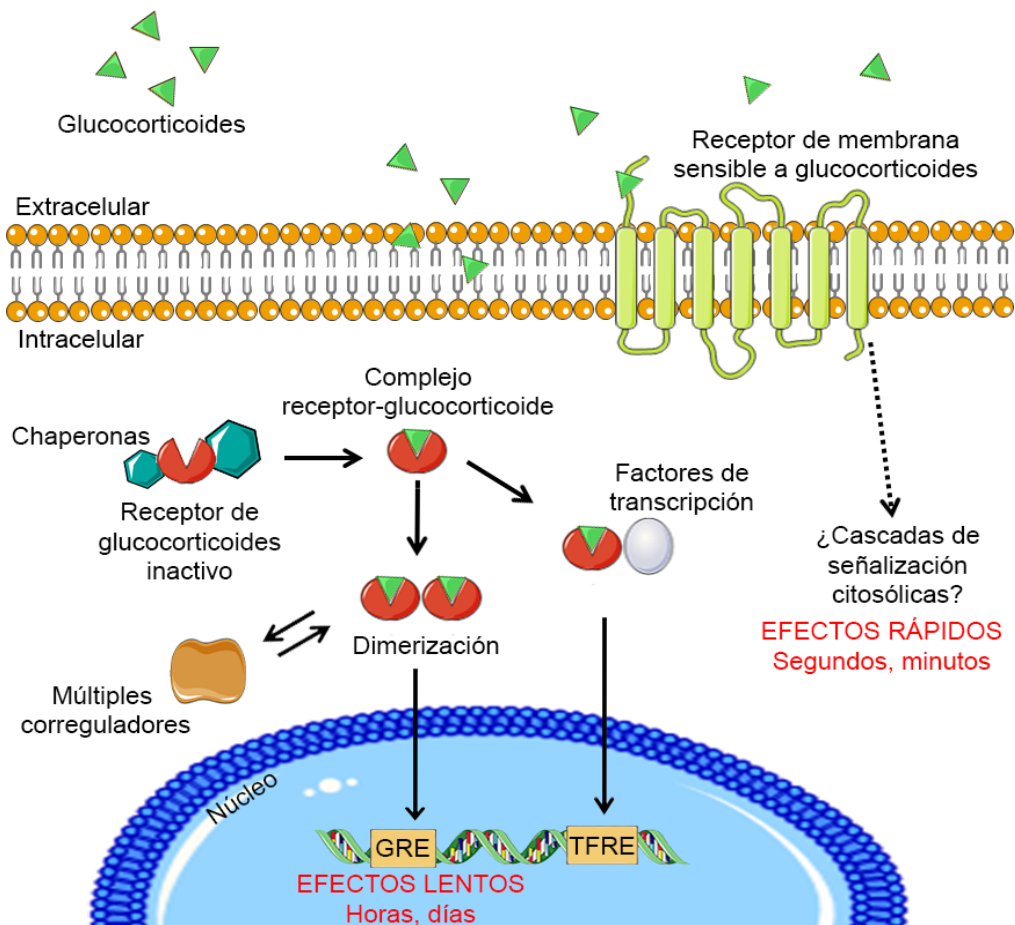
Los receptores MR y GR varían en su afinidad por los glucocorticoides, siendo la afinidad por corticosterona de los primeros del orden de 10 veces superior a la de los segundos en mamíferos. Así, la alta afinidad de los MR se activa a bajas concentraciones de glucocorticoides, es decir, en condiciones de no estrés, estarán activos y en el núcleo. Por su parte, los GR serán activados en condiciones de alta concentración de dichas moléculas, por lo que solamente se encontrarán en el núcleo en condiciones de estrés (Kitchener et al., 2004; Reul y de Kloet, 1985; Reul y de Kloet, 1986; Spencer et al., 1993). En el caso de los peces teleósteos, la carencia de una producción significativa de aldosterona hace que el cortisol sea el responsable de las acciones gluco- y mineralocorticoide (Prunet et al., 2006). Asimismo, en teleósteos, el subtipo GR1 muestra una mayor afinidad por el cortisol, siendo sensible a niveles propios de peces no estresados, mientras que es el receptor GR2 el

responsable de la respuesta a niveles elevados de cortisol en sangre (Bury y Sturm, 2007; Prunet et al., 2006; Sturm et al., 2005). Por su parte, el MR de teleósteos es sensible también a un mineralocorticoide circulante que aparece en algunas especies, la 11-desoxicorticosterona (Sturm et al., 2005) y que por tanto sería el equivalente funcional de la aldosterona de los tetrápodos.

Ambos receptores se distribuyen de manera diferente en el organismo. En el cerebro de mamíferos, los GRs se encuentran ampliamente distribuidos, localizados en neuronas y glía principalmente en el hipocampo y en las neuronas parvocelulares, mientras que los MRs solamente aparecen en el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala (Reul y de Kloet, 1985; Reul y de Kloet, 1986), estructuras relacionadas con el aprendizaje y la memoria. En teleósteos, tanto los GRs como el MR muestran una distribución bastante amplia en el cerebro. Los GR se expresan en el cerebro completo y la pineal de la tilapia (*Oreochromis mossambicus*, Benyassi et al., 2001; Nikaido et al., 2010), el bulbo olfatorio, telencéfalo, diencefalo y techo óptico de la trucha arcoíris (Teitsma et al., 1998). Los GRs y MR están presentes en la carpa común (*Cyprinus carpio*) en el encéfalo (Stolte et al., 2008). En la periferia, en todos los vertebrados estudiados, el GR está más ampliamente distribuido (Nikaido et al., 2010) que el MR que está centralizado en órganos específicos como algunas partes del cerebro, páncreas, glándulas salivares, gónadas, hígado, glándula tiroidea, riñón y corazón (Greenwood et al., 2003; Lombès et al., 1992; Moguilewsky y Raynaud, 1980; Oka et al., 2013; Sasano et al., 1992). Por otro lado, es de especial relevancia la presencia de ambos receptores en todos los vertebrados en las localizaciones clave del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal donde la densidad de los dos es especialmente alta (Hügin-Flores et al., 2004; Stolte et al., 2008; Teitsma et al., 1998).

Por otro lado, los glucocorticoides son capaces de ejercer sus acciones de manera más rápida a través de receptores de membrana en teleósteos y mamíferos (Borski, 2000; Orchinik et al., 1991). Así, por ejemplo, los efectos rápidos observados en la retroalimentación negativa de estas hormonas a nivel hipotalámico e hipofisario parecen estar reguladas a través de estos receptores (Spiga et al., 2011a). Esta vía de actuación de los glucocorticoides está ampliamente estudiada en anfibios donde se ha propuesto la existencia de uno o varios receptores de membrana acoplados a proteínas G responsables de los efectos rápidos de los glucocorticoides (Evans et al., 2000; Tasker et al., 2006). Concretamente, se ha postulado para este grupo de vertebrados la posibilidad de que el efecto a corto plazo de los glucocorticoides a través de estos receptores de membrana pueda estar mediado por la liberación de endocannabinoides (Tasker et al., 2006).

En la figura I.9 se resume el mecanismo de acción de los glucocorticoides tanto vía sus receptores intracelulares como a través de los receptores de membrana descritos en determinados grupos.



**Figura I.9. Mecanismo de acción de los glucocorticoides.** La naturaleza lipofílica de los glucocorticoides facilita su entrada por difusión a través de las membranas celulares uniéndose a receptores intracelulares que al dimerizar se translocan al núcleo donde modulan la transcripción de determinados genes que presentan en sus promotores cajas GRE (elementos de respuesta a glucocorticoides) u otros TFRE (elementos de respuesta a factores de transcripción). Asimismo, existen efectos modulados por glucocorticoides que suceden de manera rápida y parecen ser el resultado de la unión de los glucocorticoides a receptores específicos de membrana. Modificado de de Kloet et al., 2005 y Nicolaidis et al., 2010.

### Regulación de la secreción, eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

El patrón de secreción de los glucocorticoides está regulado por multitud de factores. El estimulador inmediato es la liberación de la ACTH de la hipófisis anterior, que a su vez se libera por acción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Este eje que incluye el hipotálamo, la hipófisis y la glándula adrenal forma un clásico bucle de retroalimentación negativa. Así, los glucocorticoides actúan a tres niveles para autorregular sus propios niveles plasmáticos. En primer lugar, en el hipofisario, inhibe la síntesis de ACTH actuando

directamente sobre el promotor de su gen y su liberación al bloquear la acción estimuladora de la CRH sobre las células corticotropas (Doyon et al., 2006). Además, bloquea la síntesis y liberación de CRH hipotalámico (Dallman et al., 1987; Krieger, 1982).

### **Acciones biológicas**

Los glucocorticoides regulan multitud de funciones fisiológicas (figura I.10). Su principal función en vertebrados consiste en el mantenimiento de la homeostasis entre situaciones basales y situaciones de estrés, así como regular la respuesta al estrés (Mommsen et al., 1999; Wendelaar Bonga, 1997), considerando como estrés cualquier situación que implique una activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal/interrenal (HPA/I) (Cockrem, 2013). En respuesta a una situación estresante, se estimula el eje HPA/I y como consecuencia los niveles de glucocorticoides en plasma van a aumentar a los pocos minutos (Pickering y Pottinger, 1987; Wendelaar Bonga, 1997) y van a mantenerse elevados un tiempo variable dependiendo de la duración del agente estresante (Cockrem, 2013).

Los glucocorticoides intervienen en el metabolismo de la glucosa, las grasas y las proteínas (Cherrington, 1999; Macfarlane et al., 2008; Munck et al., 1984). Para ello, regulan el metabolismo primario favoreciendo la gluconeogénesis en el hígado (Mommsen et al., 1999; Yabaluri y Bashyam, 2010), y evitando la captura de glucosa por el músculo y el tejido adiposo (Galon et al., 2002; Kuo et al., 2015; Mommsen et al., 1999), lo que a largo plazo implica una situación de hiperglucemia y resistencia a la insulina que se puede ver agravada por un descenso de los receptores de insulina presentes en el hígado (Caro y Amatruda, 1982). Asimismo, el metabolismo de proteínas en músculo esquelético se traduce en un incremento de los niveles de aminoácidos libres en sangre que se utilizan igualmente en el hígado como sustrato de la gluconeogénesis (Kuo et al., 2013), al igual que el glicerol obtenido de la lipólisis en el tejido adiposo (Divertie et al., 1991). En el páncreas, los glucocorticoides inhiben la liberación de insulina e inducen la secreción de glucagón en mamíferos (Rafacho et al., 2014). Las acciones de los glucocorticoides a nivel de metabolismo han sido ampliamente estudiadas y se describen con detalle en la revisión escrita por Mommsen y colaboradores (1999). Entre los resultados más relevantes descritos en esta revisión destaca que en multitud de teleósteos se ha detectado un incremento de la glucosa en sangre (Mommsen et al., 1999), si bien se han detectado algunas excepciones donde un incremento de los glucocorticoides plasmáticos conlleva un descenso de la glucosa en sangre (Mommsen et al., 1999). Igualmente, la cantidad de glucógeno en hígado y músculo también puede modificarse en ambos sentidos (incremento disminución) dependiendo de las especies y, en algunos casos, en la misma especie dependiendo de los estudios (Mommsen et al., 1999).

Otra de sus acciones genómicas es la de ejercer funciones antiinflamatorias e inmunosupresoras (Chrousos, 1995; Coutinho y Chapman, 2011). Para ello, en mamíferos, aumentan la concentración de neutrófilos (Dhabhar et al., 1995; Ottaway y Husband, 1994) en sangre disminuyendo el número de linfocitos por apoptosis (Wyllie, 1980) y su distribución (McEwen et al., 1997; Planey and Litwack, 2000) llegando incluso a modificar entre el 15 y el 20% del transcriptoma de los leucocitos humanos (Galon et al., 2002). En teleósteos, los glucocorticoides reducen la proliferación de leucocitos (Espelid et al., 1996; Weyts et al., 1999) que a su vez se infiltran en el timo, la cabeza del riñón, la piel y las branquias en condiciones de estrés (Balm y Pottinger, 1993; Iger et al., 1995; Maule y Schreck, 1990; Peters et al., 1991). Estas hormonas inhiben la transcripción de genes que codifican para citoquinas y quimoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión celular y enzimas clave relacionadas con la iniciación o el mantenimiento de la respuesta inflamatoria (Aluru y Vijayan, 2009; Barnes, 1998; Perretti y Ahluwalia, 2000; Smoak y Cidlowski, 2004).

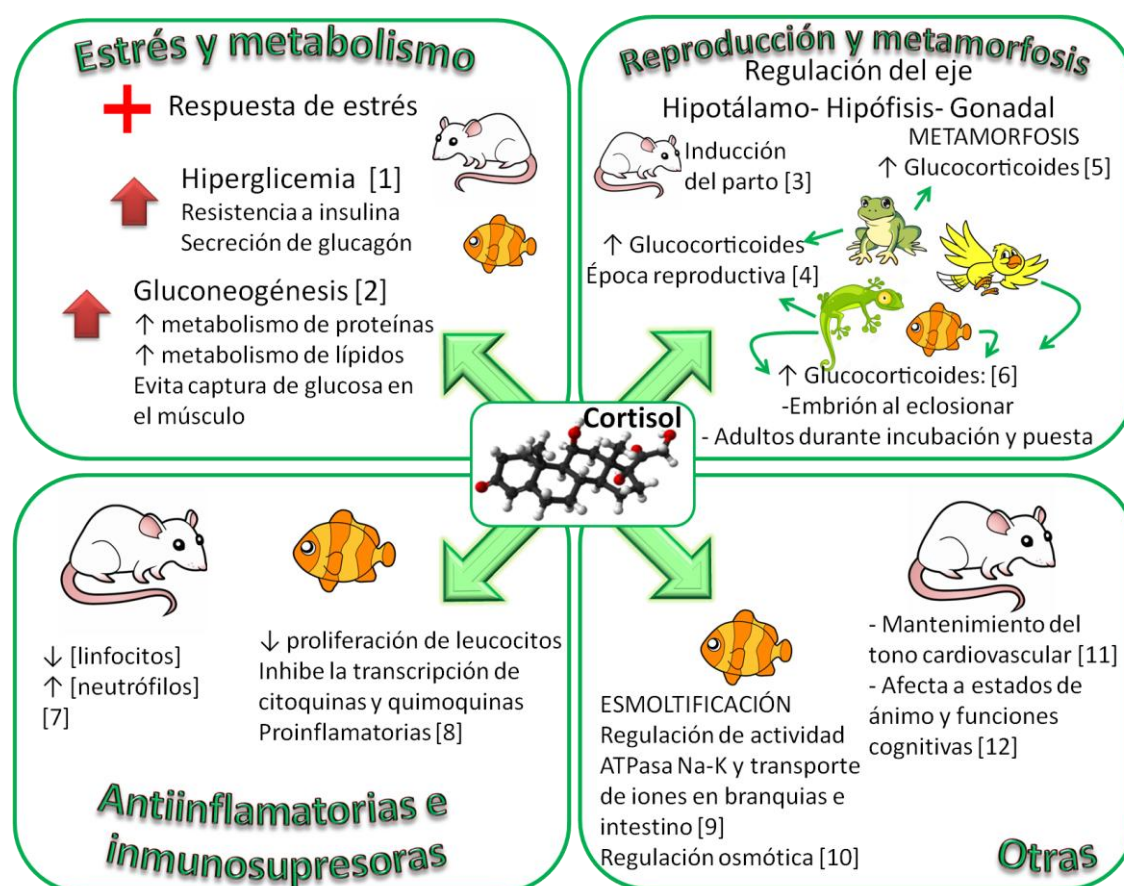
Los glucocorticoides actúan en el sistema reproductor mediante su interacción con el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. En mamíferos, se ha descrito la importancia de la presencia de un pico de dichas hormonas en el feto para inducir el parto (Wada, 2008). En anfibios y reptiles, se ha detectado un aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona en la época de reproducción (Moore y Jessop, 2003). En peces, reptiles y aves se ha detectado un aumento de la concentración plasmática de glucocorticoides en el embrión previa al momento de la eclosión, así como durante la incubación de los huevos y la puesta en los parentales (Wada, 2008).

Además, estas hormonas están relacionadas con la metamorfosis de anfibios. Este proceso fisiológico depende principalmente de las hormonas tiroideas, sin embargo, se ha demostrado que un tratamiento combinado de T3 y T4 con cortisol aumenta la velocidad de la metamorfosis (Brown y Kim, 1995; de Jesus et al., 1990; Galton, 1990; Krug et al., 1983). Asimismo, se ha visto que la corticosterona tiene un pico de concentración que coincide con el clímax de la metamorfosis (Kulkarni y Buchholz, 2014).

Asimismo, los glucocorticoides están implicados en la esmoltificación, proceso que prepara los peces anádromos para su transición de agua dulce a agua salada. Dentro de los cambios fisiológicos necesarios en estos peces, el cortisol es el encargado de regular la actividad de la ATPasa Na-K y del transporte de iones en las branquias y el intestino (Franklin et al., 1992; Ura et al., 1997).

Por otro lado, en mamíferos son responsables de mantener el tono cardiovascular (Galon et al., 2002) y pueden afectar al estado de ánimo y funciones cognitivas (de Kloet, 2000; McEwen, 2007).

Además de las acciones genómicas, las últimas décadas se está descubriendo que los glucocorticoides pueden ejercer su efecto también a nivel no genómico. En este sentido, estas hormonas actúan en la cascada de señalización dependiente de calcio (Evans et al., 2000; Tasker et al., 2006). En el caso de los peces teleósteos, se han relacionado las acciones no-genómicas del cortisol con la regulación osmótica ya que se ha descrito un bloqueo de la liberación de prolactina sucedida como consecuencia de una exposición a un medio hiposmótico (Borski et al., 1991).



**Figura I.10. Resumen de las acciones biológicas principales de los glucocorticoides en vertebrados.**

Esquema realizado aunando las diferentes acciones realizadas por la ghrelina presentes en la bibliografía. [1] Caro y Amatruda, 1982; Mommsen et al., 1999; Rafacho et al., 2014. [2] Divertie et al., 1991; Galon et al., 2002; Kuo et al., 2013; Kuo et al., 2015; Mommsen et al., 1999; Yabaluri and Bashyam, 2010. [3] Wada, 2008. [4] Moore y Jessop, 2003. [5] Brown y Kim, 1995; de Jesus et al., 1990; Galton, 1990; Krug et al., 1983; Kulkarni y Buchholz, 2014. [6] Wada, 2008. [7] Dhabhar et al., 1995; Ottaway y Husband, 1994; Wyllie, 1980. [8] Aluru y Vijayan, 2009; Barnes, 1998; Espelid et al., 1996; Perretti y Ahluwalia, 2000; Smoak y Cidlowski, 2004; Weyts et al., 1999. [9] Franklin et al., 1992; Ura et al., 1997. [10] Borski et al., 1991. [11] Galon et al., 2002. [12] de Kloet, 2000; McEwen, 2007.

### **Ritmicidad circadiana de glucocorticoides y oscilador endógeno adrenal**

Actualmente existen multitud de estudios que demuestran ritmicidad circadiana de los niveles circulantes de glucocorticoides en condiciones basales (no estresantes) en algunos vertebrados desde peces hasta mamíferos (Chan y Callard, 1972; Dupont et al., 1979; Kalsbeek y Fliers, 2013; Lance y Lauren, 1984; López-Olmeda et al., 2013; Nader et al., 2010; Ota et al., 2012; Pancak y Taylor, 1983; Smoak y Cidlowski, 2004; Thurmond et al., 1986; Westerhof et al., 1994) que parecen estar regulados por osciladores centrales y periféricos (Kalsbeek et al., 2012; Nader et al., 2010) y que persisten en condiciones de curso libre (Kalsbeek et al., 2012; Moore and Eichler, 1972; Oster et al., 2006). Esta ritmicidad se basa en la presencia de niveles más altos de cortisol o corticosterona circulantes durante el comienzo de la fase de actividad de los animales (Haus, 2007). Además, en mamíferos, se ha demostrado que este ritmo circadiano se encuentra bajo el control del núcleo supraquiasmático (NSQ) ya que, en ausencia de éste, se pierde la ritmicidad (Abe et al., 1979). También se ha demostrado que las células esteroidogénicas tienen diferente sensibilidad a ACTH dependiendo de la hora del día, efecto que parece estar mediado por el NSQ en mamíferos (Oster et al., 2006; Ulrich-Lai et al., 2006).

El reciente descubrimiento del oscilador endógeno adrenal (Chung et al., 2011; Kalsbeek et al., 2012; Nicolaides et al., 2014; Ota et al., 2012; Son et al., 2011) sugiere que puede existir un control local del ritmo de glucocorticoides. En este sentido, se han demostrado ritmos tanto circadianos como ultradianos en muchos de los componentes del eje además de los glucocorticoides, como la ACTH, el CRF en mamíferos (Henley y Lightman, 2011; Spiga et al., 2011b; Walker et al., 2010).

En peces, al igual que en mamíferos, se ha descrito la presencia de ritmos circadianos de los niveles circulantes de ACTH en carpín dorado y fluctuaciones diarias de cortisol en varias especies entre las que se encuentran el fundúlido *Fundulus grandis* (Garcia y Meier, 1973), trucha arcoíris (Rance et al., 1982), la trucha común (*Salmo trutta*; Pickering y Pottinger, 1983), la carpa común (*Cyprinus carpio*; Kühn et al., 1986), el salmón atlántico (Thorpe et al., 1987), la lubina (Cerdá-Reverter et al., 1998), el dentón común (*Dentex dentex*; Pavlidis et al., 1999), el keta o salmón chum (*Oncorhynchus keta*; Saito et al., 2004); el pez gato (*Ictalurus punctatus*; Small, 2005).

La existencia de ritmicidad en los glucocorticoides, así como el descubrimiento del oscilador endógeno adrenal parecen evidenciar que el ritmo circadiano de glucocorticoides podría estar envuelto en el mantenimiento del ajuste, sincronización, funcionamiento del



sistema circadiano, actuando como señal sincronizadora.

### 3. EL CARPÍN DORADO: CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE.

El carpín o carpa dorada, *Carassius auratus*, es un teleósteo de agua dulce perteneciente al orden Cipriniformes, Familia *Ciprinidae*, Subfamilia *Ciprininae*. Esta especie se considera una de las especies de peces pioneras en ser domesticadas y criadas en cautividad, siendo originaria de China, donde su cultivo comenzó hace más de mil años. Gracias a una gran cantidad de cruzamientos selectivos que comenzaron ya en el siglo XII, se han obtenido diversidad de variedades de estos animales. El carpín llegó a Europa desde Japón aproximadamente en el siglo XVII y en la actualidad se cría como pez ornamental.



Fotografía I.1. Ejemplar adulto de carpín dorado (*Carassius auratus*).

Morfológicamente presenta el cuerpo macizo, con la aleta dorsal de base amplia con espinas óseas y, a diferencia de otras carpas, no tiene barbillones bucales. Originalmente de color pardo amarillento o verdoso con reflejos blanco-plateados por los costados y el vientre.

Los adultos suelen medir entre 10 y 20 cm, pero pueden llegar hasta unos 45 cm como máximo. Su crecimiento por lo general es rápido, aunque viene determinado por la cantidad de alimento que pueda obtener de su hábitat.

Prefiere hábitats eutróficos, de aguas poco profundas en lagunas y ríos de corriente lenta, con fondos blandos y ricos en vegetación, temperaturas suaves o frías (entre 15°C y 23°C) y pH próximos a la neutralidad (7,0 – 7,5) (Kottelat y Freyhof, 2007). Durante el invierno permanecen casi completamente enterrados en el barro, limitando su actividad hasta la llegada de la primavera. Se adaptan con facilidad a condiciones extremas tanto de temperatura como de oxígeno, especialmente si han sido criados bajo esas condiciones (Muus y Dahlström, 1981).

El *C. auratus* es un animal omnívoro y bentónico. En cuanto a su comportamiento alimentario, se caracteriza por nadar de forma constante buscando y persiguiendo su comida.

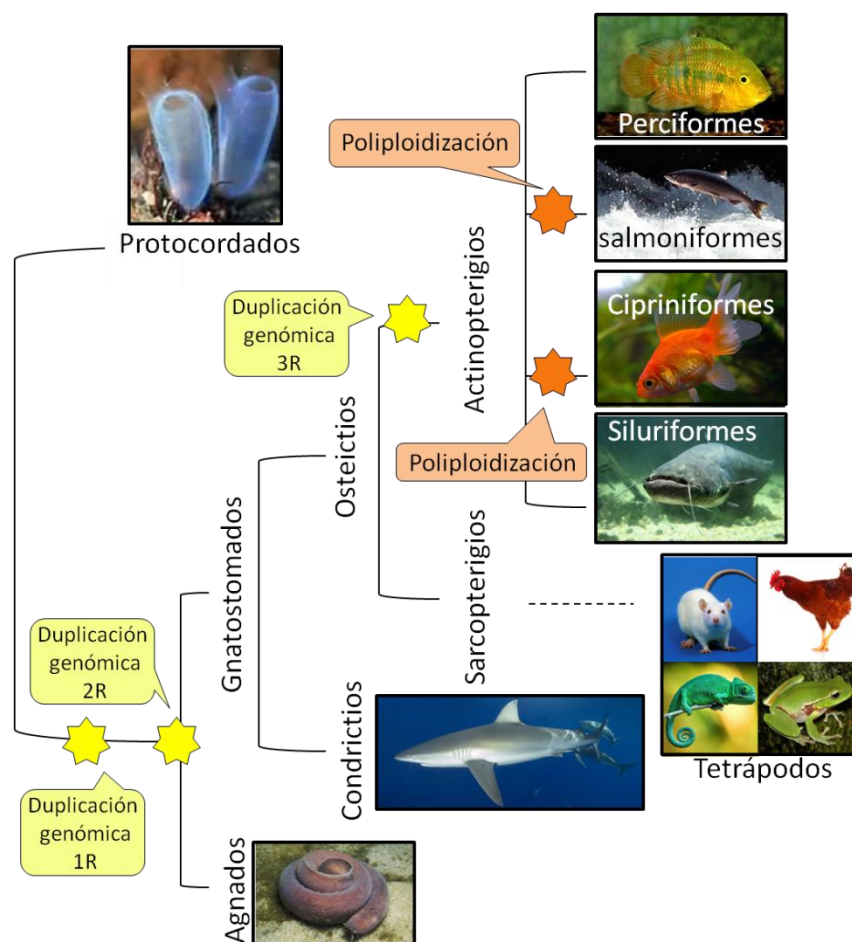
En su hábitat natural se alimenta fundamentalmente de pequeños crustáceos, moluscos, gusanos, larvas de insectos y plantas acuáticas (Muus y Dahlström, 1981). En condiciones de laboratorio, selecciona principalmente para su dieta carbohidratos, seguido de grasas y proteínas (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998).

Es una especie ampliamente utilizada en investigación, ya que por su tamaño son fácilmente manejables y no requieren cuidados excesivos para su mantenimiento. Además, se pueden obtener fácilmente de proveedores comerciales y muestran una rápida adaptación a las condiciones de laboratorio (Kottelat y Freyhof, 2007).

Con respecto a su genética, el carpín es una especie con una gran variabilidad que se traduce en la existencia de múltiples subespecies (*C. a. birgeri*, *C. a. gibelio*, *C. a. grandoculis* y *C. a. langsdorfii*) que presentan, entre otras cosas diferente poliploidía (Takada *et al.*, 2010). Entre ellos, el carpín dorado (*Carassius auratus auratus*) es una especie doméstica ornamental que ha sido producida mediante selección artificial y que se ha diseminado por el mundo (Takada *et al.*, 2010). Esta especie, como en otros teleósteos, presenta una gran cantidad de genes duplicados como consecuencia de la denominada “duplicación genómica específica de peces” descrita como 3R (Taylor *et al.*, 2001, figura I.11). Las copias de un mismo gen al inicio de la duplicación mantenían unos elementos reguladores y una secuencia de aminoácidos idénticos. Sin embargo, a lo largo de la evolución, o bien se han eliminado copias redundantes innecesarias de un gen (Lynch y Conery, 2000) o bien las diferentes copias de un mismo gen han ido cambiando para especializarse en otras funciones en ocasiones complementarias (Force *et al.*, 1999; Sidow, 1996). En el caso de los genes reloj en teleósteos se ha descrito la presencia de un mayor número de genes tanto de la familia *period* como de la *cryptochrome* (Cahill, 2002; Kobayashi *et al.*, 2000; Wang, 2008a; Wang, 2008b; Wang, 2009), como se ha descrito previamente en la presente introducción.

Hasta el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, nuestro grupo de investigación ha descrito en el carpín dorado tres genes pertenecientes a la familia *period* (*gper1a*, *gper2a* y *gper3*) y tres de la familia *cryptochrome* (*gcry1a*, *gcry2a* y *gcry3*) (Velarde *et al.*, 2009), así como un gen del bucle positivo (*gbmal1a*; Nisembaum *et al.*, 2014b). Igualmente, en los últimos años, nuestro grupo ha estudiado la regulación de los diferentes genes reloj clonados hasta el momento tanto por sincronizadores externos como el ciclo luz oscuridad o el ciclo ayuno-ingesta (Azpeleta *et al.*, 2012; Feliciano *et al.*, 2011; Nisembaum *et al.*, 2012; Tinoco *et al.*, 2014; Velarde *et al.*, 2009) como por sincronizadores internos como la orexina y la ghrelina

(Nisembaum et al., 2014a; Nisembaum et al., 2014b) en diferentes osciladores endógenos centrales y periféricos de este teleósteo.



**Figura I.11. Diagrama esquemático de la evolución genética en vertebrados.** Las duplicaciones genómicas son indicadas con las estrellas amarillas y los fenómenos de poliploidización con las estrellas naranjas. Este esquema es una traducción y simplificación del esquema de Kaiya et al., 2013 donde se muestra la evolución de los genes del receptor de ghrelina y sirve como ejemplificación del aumento del número de genes en el carpín.

## OBJETIVOS





En la actualidad, se considera que el sistema circadiano de vertebrados está formado por una red de osciladores endógenos localizados por todo el organismo, que se comunicarían entre sí mediante multitud de señales de tipo neural y hormonal. Estos osciladores se reconocen por presentar la maquinaria molecular responsable de las oscilaciones rítmicas diarias, es decir, los denominados genes reloj. Si bien existen gran cantidad de estudios que sitúan la expresión de estos genes reloj en diferentes localizaciones centrales y periféricas en vertebrados por PCR, los estudios de imagen que muestran la distribución anatómica concreta son muy escasos y mayoritariamente se han realizado en los mamíferos. En nuestro grupo de investigación se ha estudiado ampliamente la localización y funcionalidad de los osciladores endógenos que constituyen el sistema circadiano en teleósteos (utilizando como modelo el carpín dorado), mediante técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real, demostrándose la existencia de ritmos diarios de genes reloj, en localizaciones encefálicas y periféricas bajo diferentes condiciones ambientales. Hasta la fecha, no existe información sobre la distribución anatómica de dichos osciladores en el carpín y al inicio de la presente Tesis Doctoral apenas existían estudios en otros teleósteos. El interés en esta área se ha visto demostrado muy recientemente con la aparición de trabajos centrados en el estudio anatómico de los osciladores circadianos encefálicos en teleósteos. Sin embargo, todos ellos están limitados al estudio del sistema circadiano en el encéfalo sin entrar en el estudio de localizaciones periféricas.

Asimismo, la conexión entre el sistema circadiano y el sistema endocrino es un tema de gran relevancia en la actualidad. Desde que se conoce que existen una gran cantidad de osciladores en el organismo, el interés se ha centrado en analizar cómo se realiza la comunicación entre estos diferentes osciladores endógenos para, en definitiva, producir respuestas temporales coordinadas. En este sentido, algunas señales hormonales parecen especialmente relevantes en la regulación del funcionamiento molecular de los osciladores endógenos dado su carácter pulsátil, siendo candidatas a actuar como mediadores de la comunicación dentro del sistema circadiano. En los últimos años en mamíferos se ha propuesto que los glucocorticoides podrían ser una de estas señales que “sincronizaría” relojes periféricos. Más recientemente se han señalado algunas hormonas relacionadas con el balance energético y la regulación de la ingesta como posibles mediadoras de la comunicación entre el metabolismo y el sistema circadiano.

Como principal responsable del metabolismo energético, en los últimos años el hígado se ha considerado un elemento clave en dentro del sistema circadiano de mamíferos. Este órgano parece contener un oscilador especialmente sensible tanto a las condiciones

ambientales, como al estado energético del animal, considerándose un importante nexo de unión entre los sistemas circadiano y endocrino. No obstante, en la actualidad, apenas existe información que muestre la comunicación que pueda existir entre este oscilador hepático y el resto del sistema circadiano en peces teleósteos, ni qué hormonas pueden influir en su funcionamiento.

Por todo lo anteriormente expuesto, y partiendo de la hipótesis de que el balance energético ha de influir sobre el sistema circadiano probablemente a través del sistema endocrino, el **objetivo general de la presente Tesis Doctoral** es avanzar en el conocimiento sobre la relación entre el sistema circadiano y el sistema endocrino (en concreto ghrelina y cortisol), tanto a nivel anatómico (localización de los elementos de los dos sistemas), como funcional (efectos de las hormonas sobre los genes reloj). Además se ha centrado la atención en el oscilador hepático como nexo entre los sistemas metabólico, endocrino y circadiano.

Para alcanzar este objetivo general se han perseguido los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Distribución anatómica de la expresión gen reloj *gper1b* y análisis de su perfil diario de expresión. A pesar de ser el gen reloj más conservado de los parálogos *per1a* y *per1b* en los teleósteos, al comienzo de la presente Tesis Doctoral no se había clonado este gen reloj del carpín. Así, el primer objetivo fue clonar parcialmente el ARNm del gen *gper1b* y a continuación analizar su distribución anatómica en localizaciones centrales y periféricas, así como su perfil de expresión diario en presencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y ciclo ingesta-ayuno.
- ❖ Distribución anatómica del sistema ghrelinérgico. Estudios *in vivo* previos de nuestro grupo de investigación parecen indicar que la ghrelina actúa como señal reguladora de la expresión de genes reloj en el carpín, sin embargo, en la actualidad no hay evidencias que puedan dar consistencia anatómica a dicha relación. Así, el objetivo fue analizar la posible correlación anatómica entre los genes reloj y los genes del receptor de ghrelina, *ghs-r1a*, y *preproghrelina*, así como del propio péptido maduro en localizaciones centrales y periféricas del carpín dorado.
- ❖ Análisis del perfil diario de dos posibles señales sincronizadoras del sistema circadiano: ghrelina y cortisol. Un requisito necesario para considerar una señal como posible sincronizadora (*input*) del sistema circadiano es que presente ritmicidad diaria. Así, se

estudió el perfil diario de expresión de los genes *preproghrelina* y *ghs-r1a*, así como de los niveles plasmáticos de cortisol en presencia de los *zeitgebers* ciclo luz/oscuridad y horario de alimentación fijado.

- ❖ Estudio de la ghrelina y el cortisol como posibles señales moduladoras de los genes reloj en el oscilador hepático.
  - Análisis del efecto de la ghrelina, hormona de origen gastrointestinal, como moduladora de la expresión de genes reloj en hígado del carpín y los sistemas de transducción intracelulares. Una vez analizada la correlación anatómica entre el sistema ghrelinérgico y los genes reloj y tras observar la presencia de un perfil diario en su expresión, se estudió a la ghrelina como posible señal directa capaz de regular el oscilador hepático *in vitro*. Teniendo en cuenta que la ghrelina ha sido previamente descrita como una de las señales *in vivo* capaces de modular el oscilador hepático del carpín, el objetivo específico de la presente Tesis Doctoral consistió en dilucidar si este efecto observado *in vivo* sobre la expresión de genes reloj en hígado se produce de forma directa o es fruto de una señalización indirecta. Asimismo, se analizó el mecanismo de transducción de la señal desde que la ghrelina se une a su receptor de membrana hasta que se produce la regulación de la transcripción de los genes reloj.
  - Análisis del efecto de los glucocorticoides, hormona de origen interrenal, como moduladores de la expresión de genes reloj en hígado del carpín. Los glucocorticoides han sido estudiados como moduladores de la expresión de los genes reloj en el hígado de mamíferos, demostrándose tanto una acción aguda sobre los niveles de mensajero de los genes reloj, como una acción como sincronizadores de los ritmos de dichos genes en el hígado. Principalmente, se ha descrito la acción directa sobre los genes de la familia *period*, que presentan en su promotor un sitio de respuesta a glucocorticoides (GRE). Sin embargo, al comienzo de la realización de la presente Tesis Doctoral no existían datos del efecto de los glucocorticoides sobre el oscilador hepático de peces teleósteos por lo que en el presente trabajo se decidió estudiar el efecto de los glucocorticoides como moduladores de la expresión de genes reloj en el hígado del carpín a corto plazo y como sincronizadores a más largo plazo mediante aproximaciones *in vitro* e *in vivo*.





## OBJECTIVES





At present, it is considered that the circadian system of vertebrates consists of a network of endogenous oscillators spread throughout the body, which are communicated with each other through numerous neural and hormonal signals. These oscillators are recognized by the molecular machinery responsible for daily rhythmic oscillations, the so-called clock genes. While there are many studies that have reported the expression of these clock genes in different central and peripheral locations in vertebrates by PCR, imaging studies showing specific anatomical distribution are scarce and are mostly performed in mammals. In our research group, the localization and functionality of the endogenous oscillators that constitute the circadian system in teleosts (using the goldfish as model) have been extensively studied by quantitative real-time PCR, demonstrating the existence of clock genes daily rhythms in the brain and peripheral tissues under different environmental conditions. Nevertheless, to date, no information is available on the anatomical distribution of these oscillators in goldfish and, at the beginning of this PhD thesis, this aspect had barely been studied in other teleosts. The interest in this area has increased during the last years, revealed by the publication of anatomical studies reporting the encephalic distribution of the circadian oscillators in teleosts. However, all these studies are limited to the study of the circadian system in the brain without deepening into the analysis of peripheral locations.

Likewise, the connection between the circadian system and the endocrine system is a topic of great relevance nowadays. Since it is known that there are numerous oscillators distributed throughout the organism, it has been a growing interest on the analysis of how these oscillators can communicate with each other in order to ultimately produce temporary coordinated responses. In this regard, some hormonal signals appear to be particularly relevant in regulating the molecular functioning of endogenous oscillators due to their pulsatility, being candidates to act as mediators of the communication within the circadian system. In the last decades, glucocorticoids have been proposed as one of these signals able to "synchronize" peripheral clocks in mammals. Also, more recently, some hormones related to energy balance and food intake regulation have been pointed out as potential mediators of the communication between metabolism and the circadian system.

As the main responsible for energy metabolism, the liver has been considered a key element in the mammalian circadian system in the recent years. This organ appears to contain an oscillator particularly sensitive to both environmental conditions and the energy status of the animal, and so is considered an important link between the circadian and the endocrine systems. However, at present, little information is available on the possible communication

between the liver oscillator and the rest of the circadian system in teleosts, and on which hormones can influence its functioning.

For all the above, and on the assumption that energy balance influences the circadian system probably through the endocrine system, the overall objective of this PhD thesis was to delve into the knowledge of the connection between the circadian system and the endocrine system (ghrelin and cortisol specifically), both in anatomical (location of components of the two systems) and functional (effects of the hormones on clock genes) terms. Also, attention has been focused on the liver oscillator as a link between the metabolic, endocrine and circadian systems.

To achieve this overall objective, the following specific objectives have been pursued:

- ❖ Anatomic distribution of the clock gene *gper1b* expression and analysis of its daily expression profile. Despite being the most conservative clock gene among the *per1a* and *per1b* paralogs in teleosts, at the beginning of this doctoral thesis this clock gene had not been cloned in goldfish. Therefore, the first objective was to partially clone *gper1b* gene and then analyze its anatomical distribution in central and peripheral locations, as well as study its daily expression profile in the presence of both *zeitgeber*, light / dark cycle and feeding-fasting cycle.
- ❖ Anatomical distribution of ghrelinergic system. Previous *in vivo* studies of our research group suggest that ghrelin acts as a regulatory signal that modulates clock genes expression in goldfish, but no anatomical evidences are available to date to anatomically support this relationship. Thus, the objective was to analyze the possible anatomical correlation between clock genes and the ghrelin receptor, *ghs-r1a*, and *preproghrelin* genes, as well as the mature peptide itself, in central and peripheral locations of the goldfish.
- ❖ Analysis of the daily profile of two possible synchronizing signals of the circadian system: ghrelin and cortisol. A necessary requirement for a signal to be considered as a possible synchronizing input of the circadian system is that it displays daily rhythmicity. Thus, the daily expression profile of the *preproghrelin* and *ghs-r1a* genes was studied, as well as the plasma levels of cortisol in the presence of light / dark cycle and scheduled feeding.

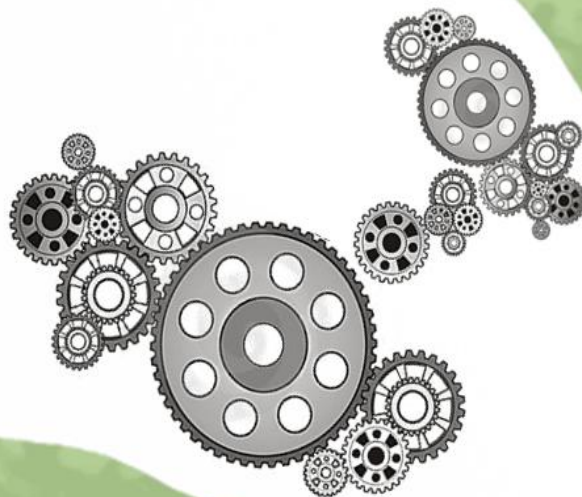
- ❖ Study of ghrelin and cortisol as possible modulating signals of clock genes in the liver oscillator.
  - Analysis of the role of ghrelin, gastrointestinal hormone, as a modulator of clock genes expression in the liver of the goldfish and of the intracellular transduction systems involved. Once the anatomical correlation between the ghrelinergic system and the clock genes was analyzed and after finding the presence of a daily profile in its expression, ghrelin was studied as a possible direct signal capable of regulating the liver oscillator *in vitro*. Given that ghrelin has been previously described as able to modulate the goldfish hepatic oscillator *in vivo*, the specific objective of this PhD thesis was to determine whether this *in vivo* effect on clock genes expression in liver is consequence of a direct action or is produced by any indirect signaling. Moreover, we studied the intracellular transduction mechanism involved in the transduction of ghrelin signaling since it binds to its receptor in the membrane until the regulation of clock genes transcription takes place.
  - Analysis of the role of glucocorticoid, interrenal hormone, as modulators of clock genes expression in the liver of the goldfish. Glucocorticoids have been studied as modulators of clock genes expression in the mammalian liver and it has been demonstrated that they exert an acute action on the expression levels of clock genes as well as act as synchronizers of their rhythms in the liver. A direct action by these hormones has been mainly described on *period* genes, which have a glucocorticoid response element (GRE) in their promoter. However, at the beginning of this PhD thesis, no data was available on the effects of glucocorticoids on the hepatic oscillator in teleosts, so we decided to study the role of these hormones as a short-term modulators, as well as longer-term synchronizers, of clock genes expression in the liver of goldfish by *in vitro* and *in vivo* approaches.



## Capítulo 1

### Estudio anatómico del sistema circadiano del carpín (*Carassius auratus*):

Distribución de *gper1b*, como componente del  
oscilador molecular y del sistema ghrelinérgico,  
como ejemplo de sistema señalizador del tiempo, en  
localizaciones centrales y periféricas del carpín.







# Capítulo 1

**Estudio anatómico del sistema circadiano del carpín (*Carassius auratus*):**

**Distribución de *gper1b*, como componente del oscilador molecular y del sistema ghrelinérgico, como ejemplo de sistema señalizador del tiempo, en localizaciones centrales y periféricas del carpín.**

- 1.1. Distribución anatómica y perfil diario de expresión del gen *gper1b* en cerebro y estructuras periféricas del carpín (*Carassius auratus*).

*Anatomical distribution and daily profile of gper1b gene expression in brain and peripheral structures of goldfish (Carassius auratus). Chronobiology International. (2015) 32(7): 889-902*

- 1.2. Distribución anatómica y perfil diario de expresión de ghrelina y el receptor de ghrelina GHS-R1 en cerebro y tracto gastrointestinal del carpín (*Carassius auratus*).

*Anatomical distribution and daily expression of ghrelin and ghs-r1 ghrelin receptor in brain and gastrointestinal tract of goldfish (Carassius auratus). PLOS One. (2015) 10(10):e0141043*



## **RESUMEN**

En este primer capítulo de la presente Tesis Doctoral, se aborda el estudio anatómico del sistema circadiano del carpín dorado a nivel encefálico y periférico, seleccionando como localizaciones extraencefálicas la hipófisis, el hígado y el tracto gastrointestinal debido a su especial interés en el campo de la comunicación entre osciladores, ya que los tres están relacionados con la ingesta como señal sincronizadora así como por la experiencia previa del grupo de investigación.

Asimismo, se investiga si estos osciladores (localizados como lugares de expresión de genes reloj) son diana de algunas hormonas, como la ghrelina recientemente asociado con una posible regulación del sistema circadiano (LeSauter et al., 2009; Nisembaum et al., 2014b; Yannielli et al., 2007) y clásicamente conocido por su relevancia en el balance energético y la ingesta en vertebrados (Abizaid and Horvath, 2012; Delporte, 2013; Sato et al., 2012). Por ello se aborda también en este capítulo el estudio anatómico y del patrón de expresión del sistema ghrelinérgico con el objeto de encontrar conexiones anatómicas entre ambos sistemas, el circadiano y el ghrelinérgico.

Los resultados que componen el presente capítulo se obtuvieron con la colaboración del grupo de investigación del Dr. Olivier Kah en la Universidad de Rennes (Rennes, Francia) gracias a dos becas de estancias breves del Ministerio de Economía y Competitividad (convocatorias 2013 y 2014), donde se llevaron a cabo los estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica y del grupo de investigación del Dr. Suraj Unniappan en la Universidad de Saskatchewan (Saskatoon, Canadá) gracias a una estancia realizada por Ayelén M. Blanco, compañera predoctoral del grupo de investigación responsable de la presente Tesis, donde se realizó el estudio del patrón de expresión de los genes *preproghrelina* y *ghs-r1*.



## 1.1. Distribución anatómica y perfil diario de expresión del gen *gper1b* en cerebro y estructuras periféricas del carpín (*Carassius auratus*).

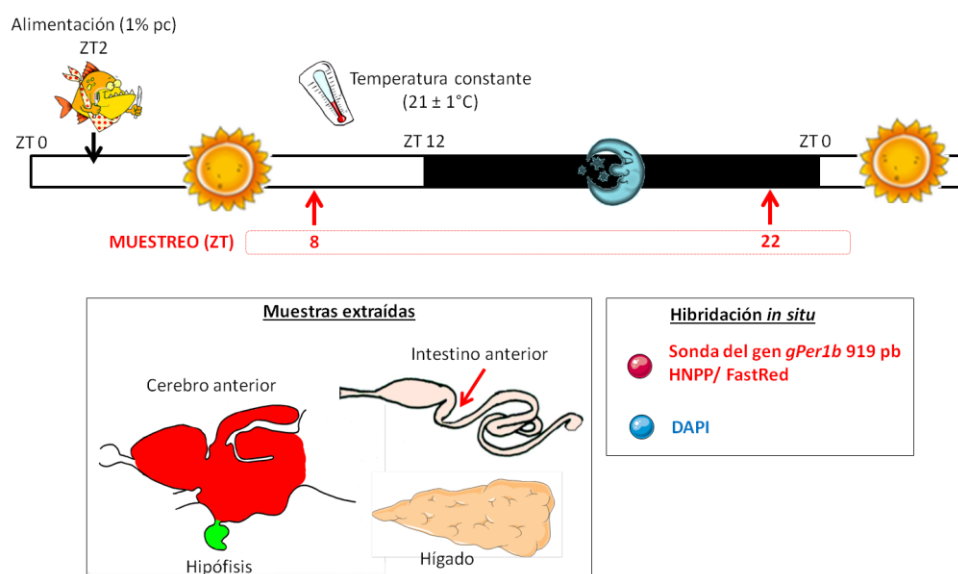
*Anatomical distribution and daily profile of gper1b gene expression in brain and peripheral structures of goldfish (Carassius auratus). Chronobiology International. (2015) 32(7): 889-902*

### DISEÑOS EXPERIMENTALES

#### 1. Estudio de la localización anatómica del gen *gper1b* en cerebro, hipófisis, hígado e intestino anterior del carpín.

En primer lugar se estudió la distribución anatómica de un componente del oscilador endógeno molecular, el gen reloj clonado en el marco de la presente Tesis Doctoral, *gper1b* y experimental descrito en la figura C1.1.

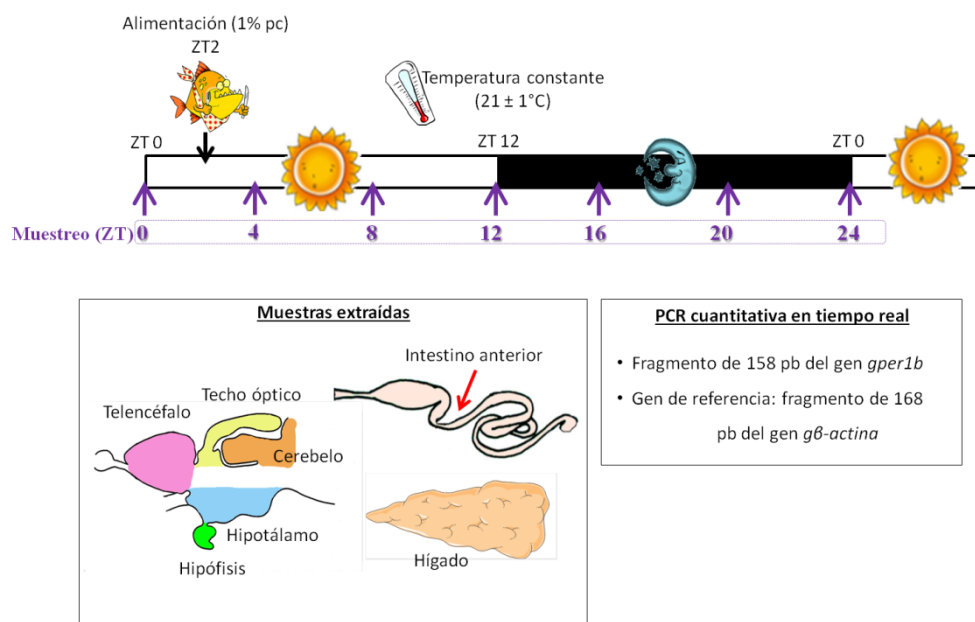
Para el estudio anatómico del gen *gper1b*, se llevó a cabo el protocolo experimental descrito en la figura C1.1. Los peces se mantuvieron en condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (12L:12D) y se alimentaron diariamente a *zeitgeber time* (ZT) 2 (considerando como ZT 0 el momento de encendido de las luces). El día del experimento los peces se anestesiaron con fenoxietanol (1 ml/l) y se perfundieron con paraformaldehído al 4% a *zeitgeber time* (ZT) 8, durante la fase luminosa del fotociclo, y a ZT 22, durante la fase oscura, extrayéndose muestras de cerebro, hipófisis, hígado e intestino anterior. A continuación se llevó a cabo la hibridación *in situ* en todas las muestras con la sonda antisentido y sentido (control negativo) para el gen *gper1b*.



**Figura C1.1. Diseño experimental del experimento para el estudio de la distribución anatómica del gen *gper1b* en encéfalo y órganos periféricos del carpín.** Se tomaron muestras de cerebro anterior, hipófisis, intestino anterior e hígado de carpines mantenidos en condiciones de aclimatación en ZT 2 (durante fase luminosa del fotociclo) y ZT 22 (durante fase oscura del fotociclo). La hibridación *in situ* se realizó mediante el uso de sondas sentido y antisentido de 919 pb del gen *gper1b*.

## 2. Estudio del patrón diario de expresión del gen *gper1b* en cerebro, hipófisis, hígado e intestino anterior del carpín.

Para el análisis del perfil diario de expresión del gen *gper1b* en las localizaciones donde se detectó señal de la sonda se realizó el protocolo descrito en la figura C1.2. Los animales se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo 12L:12D y alimentación en ZT 2 durante 15 días. El día del experimento, los animales comieron con normalidad a ZT 2. Cada 4 h los peces se anestesiaron en MS-222 (0.175 g/l) y se sacrificaron para la obtención de las muestras de telencéfalo, techo óptico, cerebelo, hipotálamo, hipófisis, hígado e intestino anterior. Las muestras fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. A continuación se llevó a cabo el análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real.



**Figura C1.2. Diseño experimental del experimento para el estudio de la expresión diaria del gen *gper1b* en encéfalo y órganos periféricos del carpín.** Se tomaron muestras cada cuatro horas de telencéfalo, techo óptico, cerebelo, hipotálamo, hipófisis, intestino anterior e hígado de carpín para analizar la posible ritmicidad diaria de la expresión del gen *gper1b* mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizaron fragmentos parciales de 158 y 168 pb respectivamente para *gper1b* y el gen de referencia *gβ-actina*.

## ORIGINAL ARTICLE

# Anatomical distribution and daily profile of *gper1b* gene expression in brain and peripheral structures of goldfish (*Carassius auratus*)

Aída Sánchez-Bretaña<sup>1</sup>, Marie-M. Gueguen<sup>2</sup>, Joel Cano-Nicolau<sup>2</sup>, Olivier Kah<sup>2</sup>,  
Ángel L. Alonso-Gómez<sup>1</sup>, María J. Delgado<sup>1</sup>, and Esther Isorna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain and <sup>2</sup>Neuroendocrine Effects of Endocrine Disruptors, INSERM (Research Institute for Health, Environment and Occupation, IRSET, INSERM U1085), SFR Biosit Université de Rennes 1, Rennes, France

The functional organization of the circadian system and the location of the main circadian oscillators vary through phylogeny. Present study investigates by *in situ* hybridization the anatomical location of the clock gene *gPer1b* in forebrain and midbrain, pituitary, and in two peripheral locations, the anterior intestine and liver, in a teleost fish, the goldfish (*Carassius auratus*). Moreover, the daily expression profiles of this gene were also studied by quantitative Real Time-PCR. Goldfish were maintained under a 12L–12D photoperiod and fed daily at 2 h after lights were switched on. A wide distribution of *gPer1b* mRNA in goldfish brain and pituitary was found in telencephalon, some hypothalamic nuclei (including the homologous to mammalian SCN), habenular nucleus, optic tectum, cerebellum and torus longitudinalis. Moreover, *gPer1b* expression was observed, for the first time in teleosts, in the pituitary, liver and anterior intestine. Day/night differences in *gper1b* mRNA abundance were found by *in situ* hybridization, with higher signal at nighttime that correlates with the results obtained by RT-PCR, where a rhythmic *gPer1b* expression was found in all tissues with acrophases at the end of the night. Amplitudes of *gper1b* rhythms vary among tissues, being higher in liver and intestine than in the brain, maybe because different cues entrain clocks in these locations. These results support the existence of functional clocks in many central and peripheral locations in goldfish coordinated, ticking at the same time.

**Keywords:** Brain, circadian system, clock gene, *in situ* hybridization, intestine, liver, pituitary

## INTRODUCTION

Cyclic environmental changes have led to the emergence of the circadian system in all living organisms, which provides them a mechanism to anticipate such external changes. This circadian system in vertebrates is composed of multiple coupled oscillators located throughout the body, in both the central nervous system and the peripheral tissues. These oscillators can be entrained by different environmental signals among which the circadian light/dark cycle is prominent (Albrecht, 2012).

The oscillator's machinery consists of interlocked autoregulatory feedback loops of clock genes that are well conserved through different groups of vertebrates (Buhr & Takahashi, 2013; Hastings et al., 2007; Partch et al., 2014) and invertebrates (Tomioka & Matsumoto, 2010). The positive limb of this loop is formed by the heterodimer CLOCK-BMAL1 that allows the expression of the genes from the families *Per* (*Period*) and *Cry*

(*Cryptochrome*) (that form the negative transcriptional limb), with an oscillation close to 24 h. The heterodimer PER-CRY, in turn, inhibits the transactivation of CLOCK-BMAL1 (Buhr & Takahashi, 2013; Hastings et al., 2007; Partch et al., 2014). In addition to this core loop, there exists an auxiliary loop formed by *Rev-erb $\alpha$*  and *ROR* genes which stabilizes the core loop mainly by modulating *Bmal1* gene expression (Partch et al., 2014).

In mammals, the expression of these clock genes has been found in a variety of encephalic areas, including the hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN, Abe et al., 2002; Amir et al., 2004; Gerstner et al., 2006; Shieh et al., 2005) considered as the master circadian clock (Albrecht, 2012; Partch et al., 2014). In addition, in rodents, clock genes have also been found in other hypothalamic nuclei (Abe et al., 2002; Gerstner et al., 2006; Girotti et al., 2009; Shieh et al., 2005), some nuclei of the limbic system (Amir et al., 2004; Namihira et al., 1999; Wakamatsu et al., 2001), the pineal gland

Submitted May 4, 2015, Accepted May 6, 2015

Correspondence: Esther Isorna, Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/ José Antonio Nováis 12, 28040 Madrid, Spain. Tel :+34 913944984. Fax: +34 913944935. E-mail: eisornaa@bio.ucm.es



(Abe et al., 2002; Namihira et al., 1999), the serotonergic raphe nuclei that are directly connected to the SCN (Abe et al., 2002), the cerebral cortex (Wakamatsu et al., 2001), the cerebellum (Namihira et al., 1999), retina (García-Fernández et al., 2007) and some olfactory related regions (Namihira et al., 1999; Wakamatsu et al., 2001). Much less studied is the peripheral location of clock genes being identified in rodents in pituitary (Girotti et al., 2009), liver (Brown et al., 2002) and intestine (Sládek et al., 2007).

In teleost fishes that represent half of the extant vertebrate species, no central clock identical to that of mammals has been identified so far. Despite the fact that the SCN is neuroanatomically well defined in fish (Rink & Wullimann, 2004), there is no evidence that it acts as a major clock. Using RT-PCR, expression of several clock genes were detected in some areas in the brain of trout (*Oncorhynchus mykiss*, Mazurais et al., 2000) zebrafish (*Danio rerio*, Moore & Whitmore, 2014; Whitmore et al., 1998), Atlantic salmon (*Salmo salar*, Davie et al., 2009), European seabass (*Dicentrarchus labrax*, del Pozo et al., 2012), Senegal sole (*Solea senegalensis*, Martín-Robles et al., 2012), threespot wrasse (*Halichoeres trimaculatus*, Hur et al., 2012) and goldfish (Velarde et al., 2009). In addition, clock genes transcripts were identified in different peripheral tissues including pituitary, heart, kidney, liver, testis, gills, intestine, muscle, ovary and spleen in zebrafish (Cermakian et al., 2000; Whitmore et al., 1998), European seabass (del Pozo et al., 2012), Senegal sole (Martín-Robles et al., 2012) and goldfish (Nisembaum et al., 2012; Velarde et al., 2009). However, there are very few studies dedicated to the accurate localization of clock gene expression in fish brain, and, to the best of our knowledge, none in peripheral tissues. Such few studies include three teleost species: zebrafish (several clock genes, Cermakian et al., 2000; Moore & Whitmore, 2014; Weger et al., 2013; Ziv et al., 2005); trout (clock gene, Mazurais et al., 2000) and flounder (*Paralichthys olivaceus*; *per2* gene, Watanabe et al., 2012).

Among clock genes, the *per* family has particular interest since their expression can be regulated, not only by the dimer CLOCK-BMAL, but also by other signals that entrain the molecular endogenous oscillators, including light/dark cycle or metabolic factors (Mracek et al., 2012; Nisembaum et al., 2014; Travnickova-Bendova et al., 2002; Vallone et al., 2004; Yamamoto et al., 2005). In mammals, three *Period* genes, *Per1*, *Per2* and *Per3* are documented (Hastings et al., 2007), while teleost fishes can have up to 5 *period* genes most likely resulting from the 3R teleost-specific genome duplication and divergent resolution of duplicated genes in different teleost orders (Wang, 2008). The gene most commonly retained by teleosts is *per1b*, whereas *per1a* disappeared in some species over time.

As much is known on its physiology and behavior, the goldfish is an interesting teleost species to study the

relationships between the endocrine and the circadian systems (Nisembaum et al., 2014; Sánchez-Bretaña et al., under review). Several clock genes, including *per1a*, have been cloned in goldfish, and daily rhythms in their expression have also been reported (Feliciano et al., 2011; Nisembaum et al., 2012; Velarde et al., 2009). However, the most preserved *per1* gene in teleosts, *per1b*, has not been cloned in goldfish to date, and no information about its role in the functioning of endogenous clocks in fish is currently available. Moreover, as previously mentioned, there are scarce data on clock gene location in fish brain, and none in peripheral tissues. Thus, the objective of the present study was to clone the clock gene *per1b* of goldfish in order to investigate its anatomical location in the brain, and peripheral locations (pituitary, liver and gut), as well as to study its daily expression pattern in these organs.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals, experimental designs and sampling

For *in situ* hybridization, 10 female goldfish ( $35 \pm 2$  g) obtained from the IFR140 (INRA SCRIBE, Rennes) were maintained in 60 L aquaria ( $n=5$  fish/aquarium) under constantly filtered water ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), and 12 h light: 12 h darkness photoperiod (12L:12D). Fish were fed daily at zeitgeber time 2 (ZT 2) with food pellets (1% body weight, bw; Novo GranoMix, JBL, GmbH & Co., Neuhausen, Germany). Fish were maintained in acclimation conditions during 20 days. On the day of the experiment, goldfish were sacrificed at ZT 8 and ZT 22. Fish were anesthetized with phenoxyethanol 1 ml/l (ICN Biomedicals Inc., Irvine, CA), and perfused intracardially with 4% paraformaldehyde (Sigma, Steinheim, Germany). Perfusion during darkness period was performed under red dim light conditions. The brain, pituitary, liver and the first portion of intestine after the bulb (from now on named anterior intestine) were removed and fixed overnight in 4% paraformaldehyde diluted in 0.1 M sodium phosphate buffer with saline (PBS, pH 7.4). Animal handling procedures comply with International Standards for the Care and Use of Laboratory Animals and were in accordance with the Guidelines of the European Union Council (2010/63/EU) for the use of research animals.

To study daily variation in gene expression, 42 goldfish ( $7 \pm 2$  g) obtained from a local supplier (ICA, Spain) were maintained in a 60 L aquaria ( $n=10$  fish/aquarium) under constantly filtered water ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), and 12L:12D photoperiod. Fish were fed daily at ZT 2 with a 1.5% bw of floating flakes (Bioflakes, Sera Pond, Heidelberg, Germany). After an acclimation period (20 days), goldfish were sacrificed by decapitation at 4 h intervals through a 24 h cycle ( $n=6$ /time point) at ZT 4, ZT 8, ZT 12, ZT 16, ZT 20, ZT 24, and ZT 4 of the following day. On the day of the experiment fish were fed as usually (ZT 2). Hypothalamus, cerebellum, telencephalon, optic tectum, pituitary, liver and anterior

intestine were quickly collected under stereo binocular microscope and immediately frozen in liquid nitrogen. Sampling during darkness period was performed under red dim light conditions. Samples were maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$  until *gper1b* expression was analyzed by quantitative Real Time PCR (RT-qPCR). Animal handling procedures comply with International Standards for the Care and Use of Laboratory Animals and were in accordance with the Spanish Directive 1201/2005 for the use of research animals.

### Molecular cloning of *gper1b* gene and riboprobe synthesis

For the molecular cloning of *gper1b* gene, degenerated primers were designed (Table 1). The reaction mixture contained cDNA from goldfish retina, forward and reverse primers (3 nM each), Taq DNA Polymerase and its buffer (0.00125 U; Invitrogen), dNTPs (8  $\mu\text{M}$  each) and  $\text{MgCl}_2$  (72  $\mu\text{M}$ ). PCRs were performed in a total volume of 25  $\mu\text{l}$ . PCR conditions were set at  $95^{\circ}\text{C}$  for 3 min followed by 40 cycles of  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 s,  $60^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min, and a final step of  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 min. The amplified products were run on an agarose gel and purified using GenElute gel extraction kit (Sigma, Steinheim, Germany). Purified PCR products were ligated into pCR<sup>TM</sup>4-TOPO<sup>®</sup> vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and employed to transform *Escherichia coli* JM109 cells (Promega, Madison, WI). Positive clones were collected and plasmid DNA extraction was performed using a routine miniprep protocol. Nucleotide sequences were determined by sequencing the obtained fragment of 919 bp using T7 and T3 primers (Secugen SL, Madrid, Spain).

Phylogenetic analysis was performed by aligning the goldfish *gper1b* sequence with those of other vertebrates retrieved from GenBank (NCBI) and Ensembl Genome using ClustalX ver. 2.1 (Dublin, Ireland). A phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-Joining method, with 1000 replicates for the bootstrap test. The FigTree v1.3.1 software (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/fig-tree/>) was used for the graphical representation (S1).

The probes for hybridization studies were synthesized from the fragment of 919 bp of *gper1b* (accession number KP663726) inserted into pCR<sup>TM</sup>4-TOPO<sup>®</sup> vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) obtained as described above. Antisense and sense mRNA probes were obtained with

DIG RNA labeling MIX (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) by *in vitro* transcription with T7 and T3 polymerases (Promega, Madison, WI, USA) and linearized with *SpeI* and *NotI*. To confirm the specificity of the *gper1b* probes, parallel series of slides were always hybridized with the correspondent sense RNA probes.

### In situ hybridization

The samples of brain, pituitary, liver and anterior intestine maintained in 4% paraformaldehyde overnight were dehydrated, embedded in paraffin and sectioned at 6  $\mu\text{m}$ . In the case of brain, transverse sections were mounted onto poly-L-Lysine-coated slides. The protocol for ISH was performed as previously described (Escobar et al., 2013) with slight modifications. Paraffin sections were deparaffinized with OTTIX Plus (DiaPath, Martinengo, Italy) and rehydrated through a series of graded ethanol (100-30%). Sections were then washed with 0.85% NaCl and PBS before postfixation in *Antigenfix* (DiaPath, Martinengo, Italy) for 20 min. After washing in PBS, sections were treated for 5 min at  $37^{\circ}\text{C}$  with proteinase K (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma, Steinheim, Germany) diluted in PBS, and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min. Sections were rinsed twice in 2x standard saline citrate (SSC). Hybridization was performed at  $65^{\circ}\text{C}$  overnight in a humidified chamber using 100  $\mu\text{l}$  hybridization buffer (50% deionized formamide; 2x SSC; 5x Denhardt's solution; 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of yeast tRNA; 4 mM EDTA; 2.5% dextran sulfate) containing the DIG-labeled probe (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). After hybridization, slides were washed in 2x SSC at  $65^{\circ}\text{C}$  ( $2 \times 30$  min), 2x SSC/50% formamide at  $65^{\circ}\text{C}$  ( $2 \times 30$  min), 0.2x SSC ( $1 \times 15$  min) and 0.1x SSC ( $1 \times 15$  min) at room temperature. Slides were next washed in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 150 mM NaCl for 10 min, then washed in the same buffer containing 0.1% Triton and 0.5% of skimmed milk powder ( $2 \times 30$  min), and incubated overnight at room temperature with anti-digoxigenin alkaline phosphatase Fab fragments (1:2000; Roche Pharma, Mannheim, Germany). On the next day, slides were incubated for 4–5 h with an HNPP (2-hydroxy-3-naphtoic acid-2'-phenylamide phosphate)/FastRED detection kit (Roche Pharma, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. Finally, slides were coverslipped with Vechashield mounting medium containing

TABLE 1. Accession numbers of the genes of interest and primers sequences employed in quantitative qRT-PCR studies.

Target gene	Accession number		Primer sequences 5' $\rightarrow$ 3'	Product (pb)
Primers for cloning <i>gper1b</i>	KP663726	Forward	CAGTGGCTCGAATGAGCACC	919
		Reverse	TARTCHCGAGARCARGCAC	
Primers for qRT-PCR <i>gper1b</i>	KP663726	Forward	CTCGCAGCTCCACAAACCTA	159
		Reverse	CACAACAGCTGCAGAGGAAAT	
$\beta$ -actin	AB039726	Forward	CAGGGAGTGATGTTGGCA	168
		Reverse	AACACGCAGCTCGTTGTAGA	

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Fluorescent histological sections were analyzed with the aid of an ApoTome<sup>®</sup> microscope and AxioVision software (both Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Germany). Samples were analyzed with a blind protocol in which the experimental group (ZT 8 or ZT 22) was unknown. Plates were assembled using Photoshop CS6 (Mountain View, CA).

### Real time PCR

Daily variations in *gper1b* transcription were measured by quantitative RT-PCR, using goldfish *gβ-actin* as reference gene. Specific primers are shown in Table 1. Total RNA extraction (TRI<sup>®</sup> Reagent method, Sigma Chemical, Madrid, Spain), DNase treatment (Promega, Madison, WI), cDNA synthesis (Superscript Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA) and RT-qPCR reactions (iTaQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix in a CFX96<sup>™</sup> Real-Time System, Biorad Laboratories, Hercules, CA) were carried out as previously described (Nisembaum et al., 2014), with minor modifications. The integrity of the obtained RNA was analyzed on a 1% agarose denaturing electrophoresis gel. PCR reactions were developed in a final volume of 10 μl and 1 μl of cDNA was employed in each. Conditions employed were 30 sec at 95 °C and 40 cycles consisting of 5 sec at 95 °C and 30 s at 60 °C. Calibration curves were made with serial dilutions of cDNA (analyzed by triplicate) and exhibited efficiencies around 100%. Experimental samples were analyzed in duplicate. Negative controls included replacement of cDNA by water and the use of non-retrotranscribed total RNA. The specificity of the amplification was confirmed by the melting temperature of PCR products (measured at the end of all reactions) and by the size in an agarose gel. The relative mRNA expression was determined by the  $\Delta\Delta C_t$  method (Livak & Schmittgen, 2001).

### Data analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student–Newman–Keuls (SNK) *post-hoc* test was performed for analyzing differences in *gper1b* abundance among the different time points studied. When it was necessary, data were transformed to logarithmic or square root scale to adequate them to a normal distribution. A probability level of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

Moreover, daily rhythms in *gper1b* expression were determined by fitting the data to a sinusoidal function by the least squares method described by Duggleby (1981). The formula used was  $f(t) = M + A \cos(t\pi/12 - \varphi)$ , where  $f(t)$  was the gene expression level at a given time, the mesor ( $M$ ) is the mean value,  $A$  is the sinusoidal amplitude of oscillation,  $t$  is time in hours, and  $\varphi$  is the acrophase (time of peak expression). Non-linear regression allows the estimation of  $M$ ,  $A$ , and  $\varphi$ , and their standard error (SE), being the SE based on the residual sum of squares in the least-squares fit (Duggleby, 1981).

Significance of cosinor analysis was defined by the noise/signal of amplitude ( $A$ ) calculated from the ratio  $SE(A)/A$  (Feliciano et al., 2011; Nisembaum et al., 2012). Expression was considered to display a daily rhythm if it had both.  $p < 0.05$  by ANOVA and  $SE(A)/A < 0.3$  by cosinor analysis.

## RESULTS

### Molecular cloning of *gper1b* gene

The cloning strategy described in the “Materials and Methods” section allowed obtaining a 919 bp partial sequence, and a translated 282 aa sequence was deduced (it includes a stop codon in the 840 bp). Goldfish *per1b* deduced protein showed high-identity/homology with other teleost fish *per1b*as cavefish 82% (*Phreatichthys andruzzii*, ADL62689.1) and zebrafish 81% (AAI63718.1), while the homology with *per1a* from goldfish (ABU93788.1) and zebrafish (AAI63543.1) is 60% and 51%, respectively. The constructed phylogenetic tree confirms that the partial sequence cloned correspond to *per1b* gene orthologue (S1).

### Distribution of *gper1b* expressing cells in goldfish brain, pituitary, liver and anterior intestine

The labeling generated by the *gper1b* antisense riboprobe was consistently observed surrounding the nucleus of cells (Figure 1A, C–D), while the sense riboprobes yielded no signal (Figure 1B), supporting the specificity of the obtained signal under the stringent conditions employed. Only some blood cells exhibited autofluorescence with sense and antisense riboprobes (Figure 1A–B, D). In general, labeled cells were located in the brain parenchyma and cells in the outer limit of the brain do not show *gper1b* expression in any case (Figure 1D, 2A–B).

In all animals, the brain showed a widespread distribution of *gper1b* mRNA in many regions (Figure 2). In the telencephalon, *gper1b* expressing cells were found in both pallial (mostly in Dm) and subpallial areas (Figure 2A–B, G), in the nucleus taeniae and in the entopeduncular nucleus (Figure 2B, G). In the diencephalon, *gper1b* signal can be observed in the preoptic region, notably in the anterior periventricular preoptic nucleus as well as in the magnocellular preoptic nucleus, the posterior periventricular nucleus (Figure 2B, G) and, interestingly, in the anterior periventricular nucleus (NAPv), which is considered as the homologous to the mammalian SCN (Figure 2B, G). However, in this latter structure the labeling did not appear to be much stronger than in other brain regions, whatever the time of sampling. There were also numerous *gper1b* expressing cells in the habenular nuclei (Figure 2C, H), in nuclei of the mediobasal hypothalamus, such as the posterior part of the lateral tuberal nucleus, and the nuclei of the lateral and posterior recessi and in the lateral portion of the preglomerular nucleus (Figure 2B, D, F, G, H). In more posterior of the



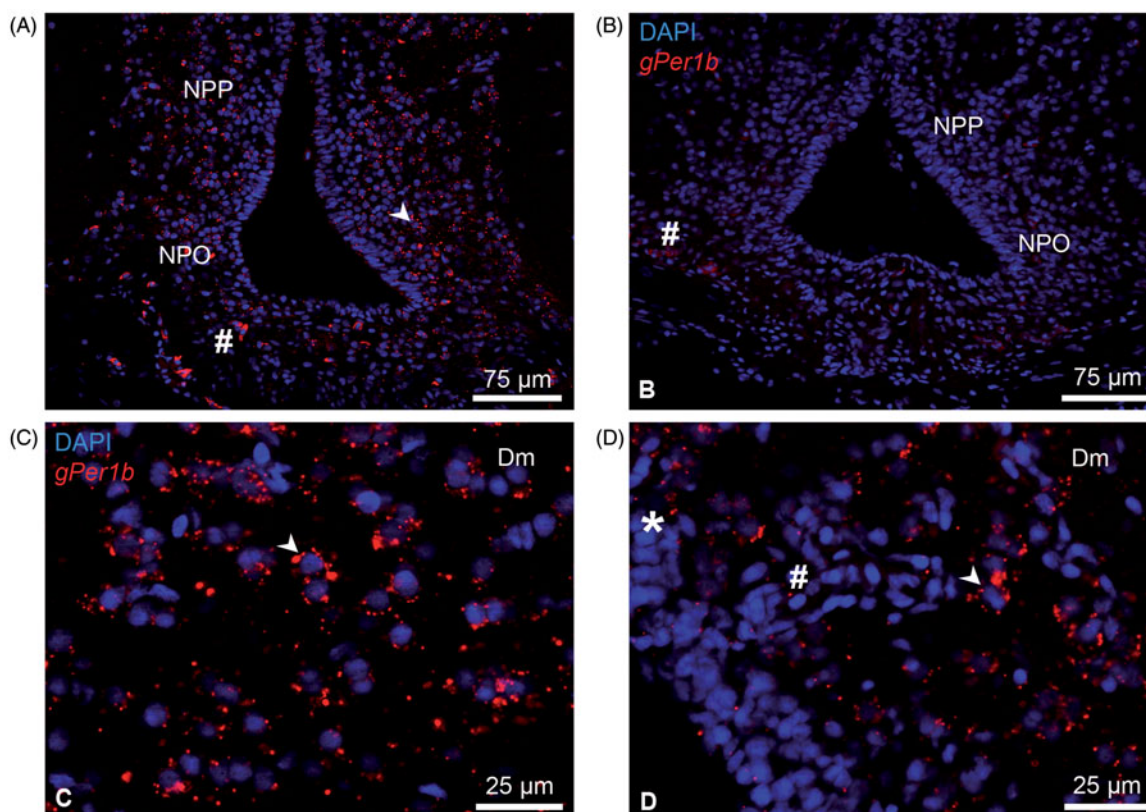


FIGURE 1. Specificity of the *gper1b* mRNA riboprobe. (A, B) Preoptic recess area showing antisense (arrowheads) and sense riboprobes staining, respectively. NPO preoptic nucleus, including parvocellular and magnocellular part; NPP preoptic periventricular nucleus. (C) Examples of telencephalic nucleus surrounded by *gper1b* mRNA riboprobes (arrowheads). Dm medial portion of the dorsal telencephalon. (D) Telencephalic outer layer showing *gper1b* positive (arrowheads) and negative cells (asterisk). #: Blood cells with unspecific staining.

goldfish mesencephalon, a very prominent population of *gper1b* expressing cells was found in the periventricular gray zone of the optic tectum and in the torus longitudinalis, and also in the metencephalon in the valvula cerebelli (Figure 2E, I).

In peripheral organs, *gper1b* transcripts were detected in both the pars distalis and the pars intermedia of the pituitary, in many cells of the liver and in the mucose, submucose and to a lesser extent in the muscular layers of the anterior intestine (S2).

### Daily variations of *gper1b* expression

Our *in situ* hybridization study investigated the possible fluctuations of *gper1b* mRNA expression at two different times of light/dark cycle. It was clear that the highest levels were found during the night in almost all locations (Figures 3 and 4, Table 2, S3). In the telencephalon and the pituitary no evident or slight day–night differences were found in a blind-experiment assay (Table 2, S4).

In that respect, in the habenular nuclei (Figure 3A, B) and in the torus longitudinalis (Figure 3C, D), the *in situ* hybridization signal of *gper1b* appeared clearly higher during the night (ZT22) than during daytime (ZT8). Day–night differences were even higher in the periventricular gray zone of the optic tectum (Figure 3E, F) and in the valvula cerebelli (Figure 3G, H), where there is almost no

presence of the transcripts during the day while in the night the signal became obvious. In the hypothalamus, differences between nocturnal and diurnal *gper1b* signal can be observed in almost all the nuclei that showed *gper1b* (Figure 4, S3). Of particular interest is the fact that in the NAPv that is considered as the homologous to mammalian SCN, *gper1b* transcripts were only found during the dark period, but not with higher mRNA abundance than other hypothalamic nuclei (Figure 4).

In the pituitary, *gper1b* expression was also increased during the scotophase in the pars distalis (Figure 5A, B) and also in pars intermedia (Figure 5C, D), but with less difference between day and night levels of expression. Finally, in all layers of the anterior intestine in which *gper1b* expressing cells were found, the nocturnal expression was higher than diurnal one (Figure 5E, F), which was also the case of the liver (Figure 5G, H).

The daily profiles of *gper1b* expression obtained by qRT-PCR in the different goldfish brain regions (Figure 6) and peripheral locations (Figure 7) were in good accordance with the results obtained by *in situ* hybridization. All the brain regions analyzed presented daily *gper1b* significant expression rhythms ( $p < 0.05$  by ANOVA and  $SE(A)/A < 0.3$ ) with maximum values at the end of the scotophase and the beginning of the light phase (Figure 6). The parameters defining such 24 h

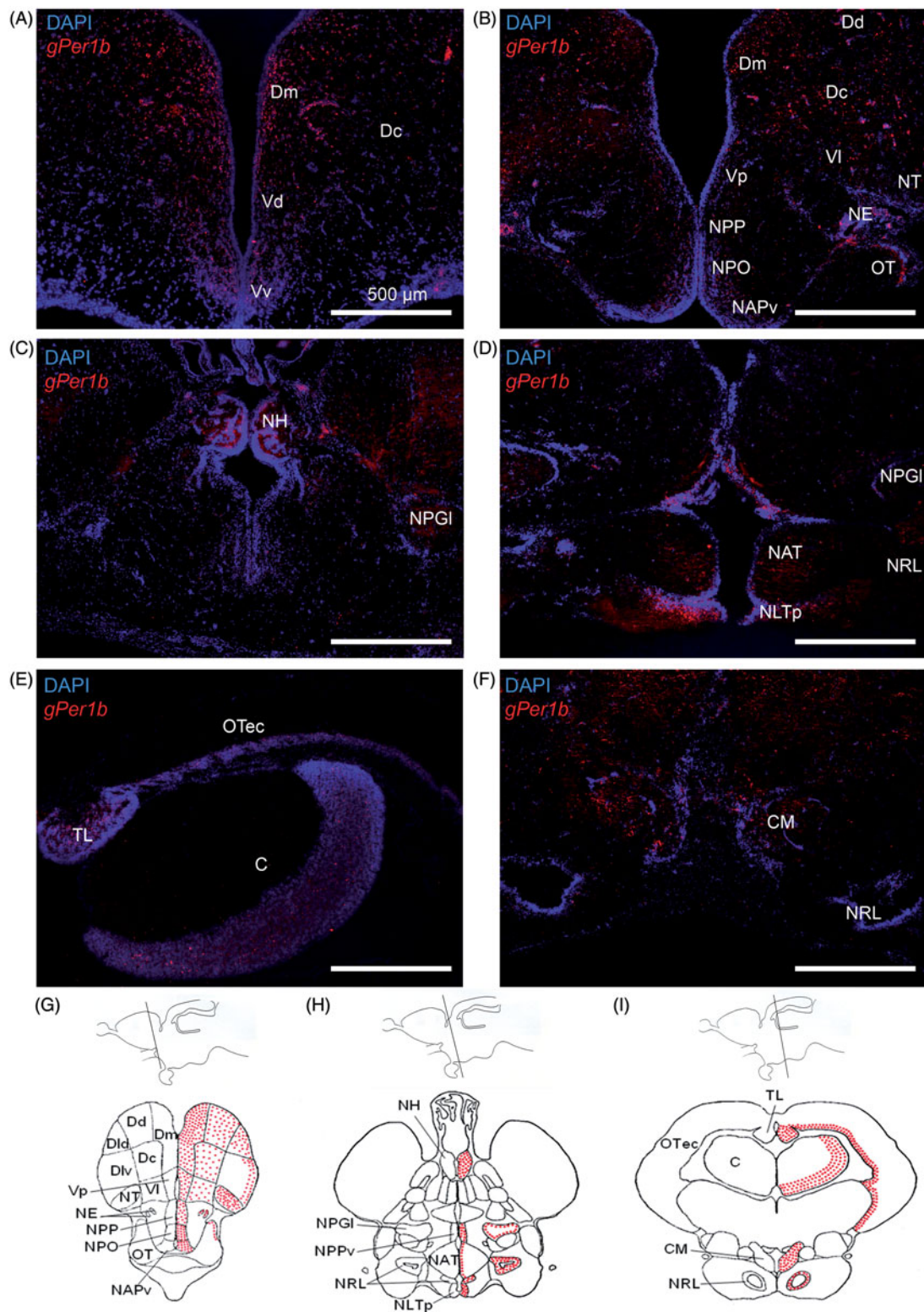


FIGURE 2. Distribution of *gper1b* expressing cells in the brain of goldfish. (A–F) Representative sections of *gper1b* positive structures. (G, H, I) Schematic representation of *gper1b* expressing cells on representative sections taken from the *Carassius auratus* forebrain atlas (Peter & Gill, 1975; G corresponds to A, B; H corresponds to C, D; I corresponds to E, F). C cerebellum; CM mamillary bodies; Dc central portion of the dorsal telencephalon; Dd dorsal portion of the dorsal telencephalon; Dld dorsal part of the lateral portion of the dorsal telencephalon; Dlv ventral part of the lateral portion of the dorsal telencephalon; Dm medial part of the dorsal portion of the telencephalon; NAPv anterior periventricular nucleus; NAT anterior tubular nucleus; NE entopeduncular nucleus; NH habenular nucleus; NLTp posterior part of the lateral tubular nucleus; NPGI lateral portion of the preglomerular nucleus; NPO preoptic nucleus; NPP Preoptic periventricular nucleus; NPPv posterior periventricular nucleus; NRL nucleus of the lateral recess; NT taenia nucleus; OT optic tract; OTec optic tectum; TL torus longitudinalis; Vd dorsal portion of the ventral telencephalon; VI, lateral portion of the ventral telencephalon; Vp postcommissural portion of the ventral telencephalon; Vv ventral portion of the ventral telencephalon.



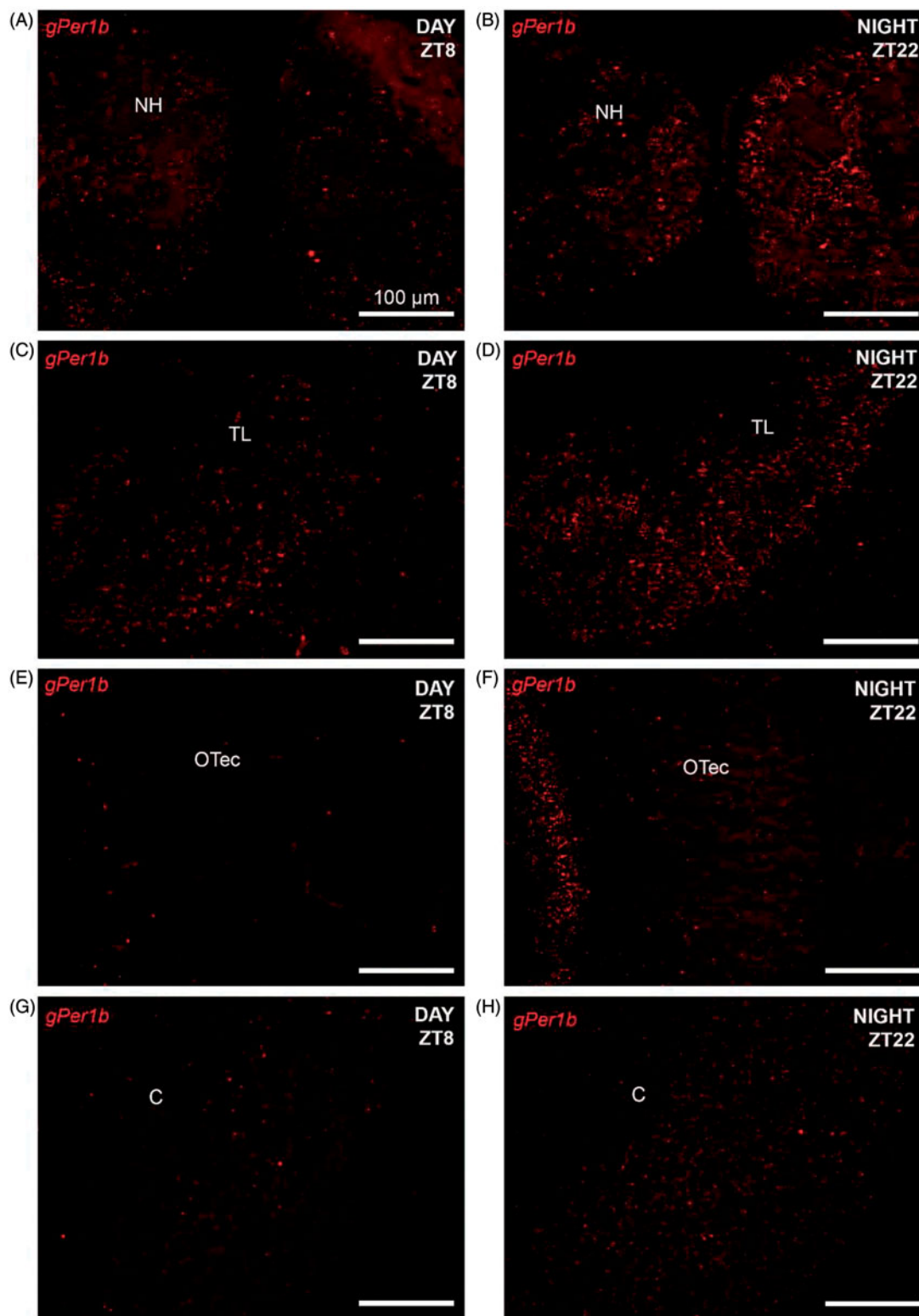


FIGURE 3. Day/night expression of *gper1b* in the brain of goldfish. Expression of *gper1b* mRNA at daytime (ZT8, figures on the left) and nighttime (ZT22, figures on the right) in the habenular nucleus (A, B), torus longitudinalis (C, D), periventricular gray zone of the optic tectum (E, F) and the valvula cerebelli (G, H). C, cerebellum; NH, habenular nuclei; OTec, optic tectum; TL, torus longitudinalis.

rhythms obtained with the cosinor analysis are shown in Table 3. The acrophases of the rhythms were around ZT 20–23, while more variations in the amplitude can be observed, with the lowest values in telencephalon and

the highest in the liver (Figures 6 and 7, Table 3). The acrophase of *gper1b* expression rhythms occurs around the same time of light/dark cycle, close to the lights on in the brain (cerebellum, hypothalamus, optic tectum

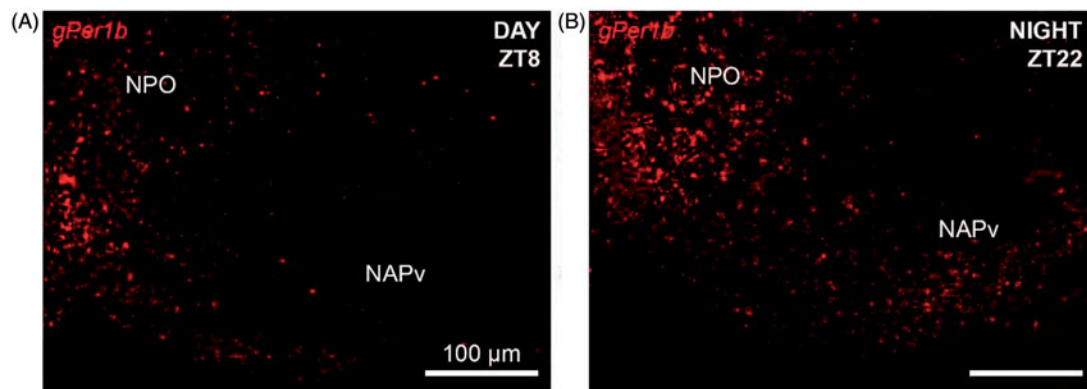


FIGURE 4. Day/night expression of *gper1b* in hypothalamic nucleus considered as the homologous to the mammalian SCN, NAPv, and in NPO of goldfish. Expression of *gper1b* mRNA at daytime (ZT8, figures on the left) and nighttime (ZT22, figures on the right). NAPv, anterior periventricular nucleus; NPO, preoptic nucleus.

TABLE 2. Day/night differences in *gper1b* expression in goldfish brain observed by *in situ* hybridization.

	Day	Night
<b>TELENCEPHALON</b>		
Subpallium		
Dorsal part (Vd)	+++	+++
Lateral part (Vl)	+	+
Postcommisural part (Vp)	+	+
Ventral part (Vv)	++++	++++
Pallium		
Central part (Dc)	++	++
Dorsal part (Dd)	++	++
Medial part (Dm)	+++	++++
Amygdala		
Nucleus Taeniae (NT)	+	+
Basal Ganglia		
Entopeduncular nucleus (NE)	++	++
<b>DIENCEPHALON</b>		
Habenula (NH)	+	+++
Mamillare body (CM)	++	++
Hypothalamus		
Anterior periventricular nucleus (NAPv)	–	+++
Anterior tuberal nucleus (NAT)	+	+
Lateral tuberal nucleus, posterior part (NLTP)	+	++++
Lateral recess nucleus (NRL)	++	+++
Magnocellular preoptic nucleus (NPO)	++	++++
Periventricular preoptic nucleus (NPP)	++	++
Periventricular posterior nucleus (NPPv)	–/+	++++
Preglomerular nucleus, lateral part (NPGl)	++	+++
<b>MESENCEPHALON</b>		
Torus longitudinalis (TL)	++	++++
Optic tectum (OTec)	–/+	+++
<b>METENCEPHALON</b>		
Valvula cerebelli (C)	–/+	+++

Scale: – no expression; –/+ very low expression; + low expression; ++ moderate expression, +++ high expression; ++++ very high expression.

and telencephalon, Figure 6, Table 3), and at the second half of scotophase in the peripheral tissues (pituitary, anterior intestine and liver, Figure 7, Table 3). Remarkably, the amplitudes of *gper1b* expression were much higher (5 times) in the liver and anterior intestine than in the different studied areas of the goldfish brain

(Figure 7, Table 3). Moreover, the lowest amplitudes of *gper1b* expression rhythms were observed in the pituitary and telencephalon (Figures 6 and 7, Table 3), in accordance to the *in situ* hybridization results where the day/night differences were weaker or not apparent (Figure 5A, D, Table 2, S4)

## DISCUSSION

The present study reports a detailed description of the central and peripheral sites of *gper1b* expression in the goldfish, as well as quantification over a dark/light cycle of the mRNA transcripts in both the brain and some peripheral organs. The data clearly show that *gper1b* is widely expressed in many cells of the goldfish, either in the brain or in the periphery, and that *gper1b* transcripts exhibit daily rhythmicity throughout the 24-h light/dark cycle in all the tissues examined, with high values late in the dark phase.

Detailed reports on the sites of expression of clock genes are very limited and accurate information is so far limited to zebrafish, flounder and rainbow trout (Mazurais et al., 2000; Moore & Whitmore, 2014; Watanabe et al., 2012; Weger et al., 2013). In zebrafish, several studies demonstrated the wide expression of *clock*, *per1b*, *per2*, *cry1*, *bmal1* and *per3* in many brain regions of the forebrain and midbrain. This is lined with the regions exhibiting rhythmic luciferase activity under the regulation of a minimal promoter with four E-boxes in a transgenic model of zebrafish (Weger et al., 2013). In the rainbow trout, *clock* is also expressed in many regions with the highest expression in the pretectal area, the optic tectum and the cerebellum, although *clock* transcripts were also evidenced in the preoptic area and the periventricular mediobasal hypothalamus (Mazurais et al., 2000). That general distribution matches well with the data obtained in the present study regarding *gper1b* expression in goldfish.

Interestingly, up to now, no master clock has been evidenced in the brain of fish (Weger et al., 2013). Indeed, contrasting with mammals in which the SCN is

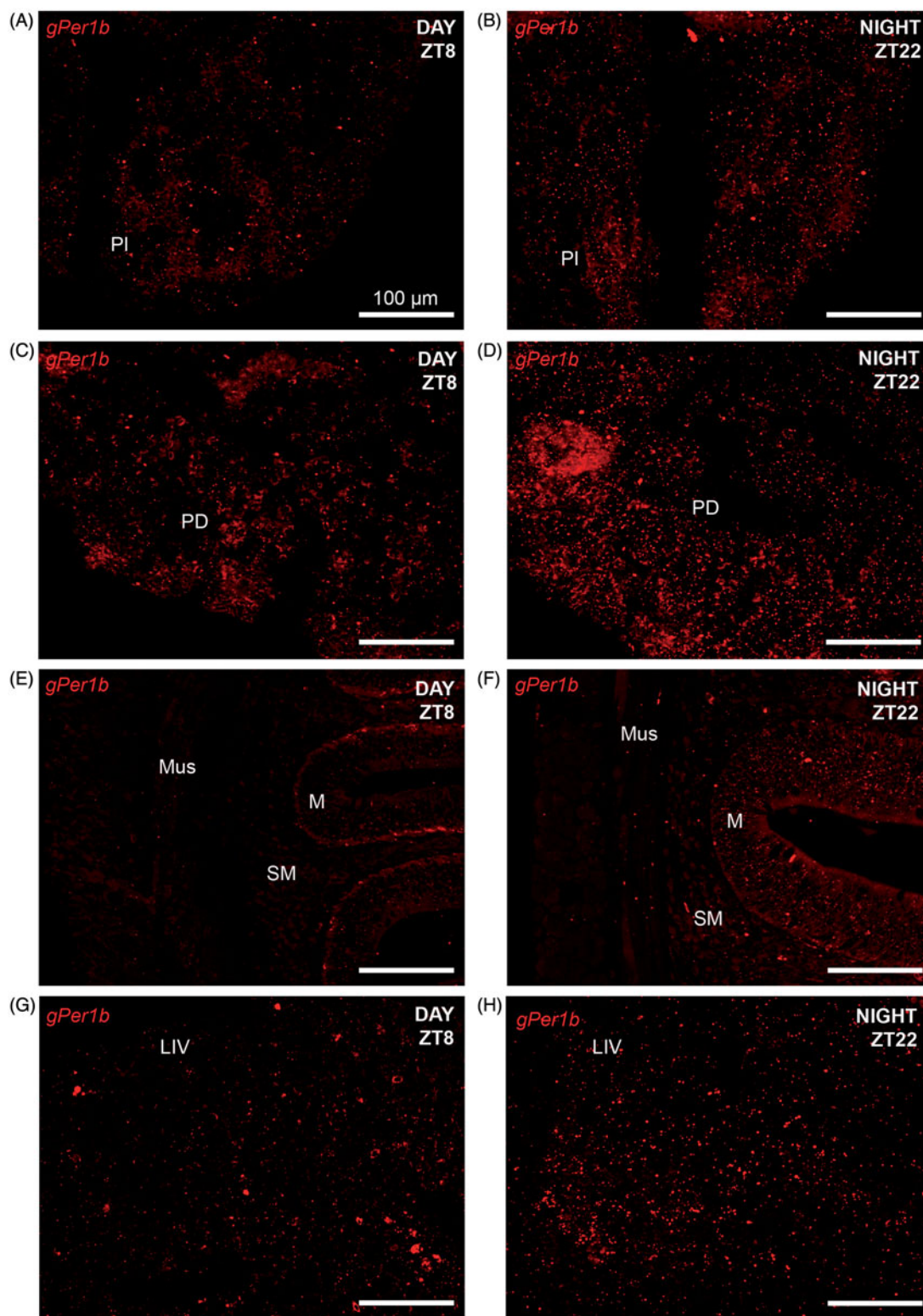


FIGURE 5. Day/night expression of *gper1b* in peripheral locations of goldfish. Expression of *gper1b* mRNA at daytime (ZT8) and nighttime (ZT22) in pars intermedia of the pituitary (A, B), pars distalis of the pituitary (C, D), the mucose, submucose and muscular layers of the anterior intestine (E, F) and the liver (G, H). LIV, liver; M, mucose; Mus, muscular layer; PD, pars distalis; PI, pars intermedia; SM, submucose.

clearly a central clock that controls second order peripheral oscillators and drives many circadian activities (Albrecht, 2012), the brain of fishes does not appear to possess a functionally equivalent structure

(Noche et al., 2011; Weger et al., 2013). Even if it is known that fish do possess a brain structure that is anatomically equivalent to the SCN that receives afferents from the retina (Fraley & Sharma, 1984;



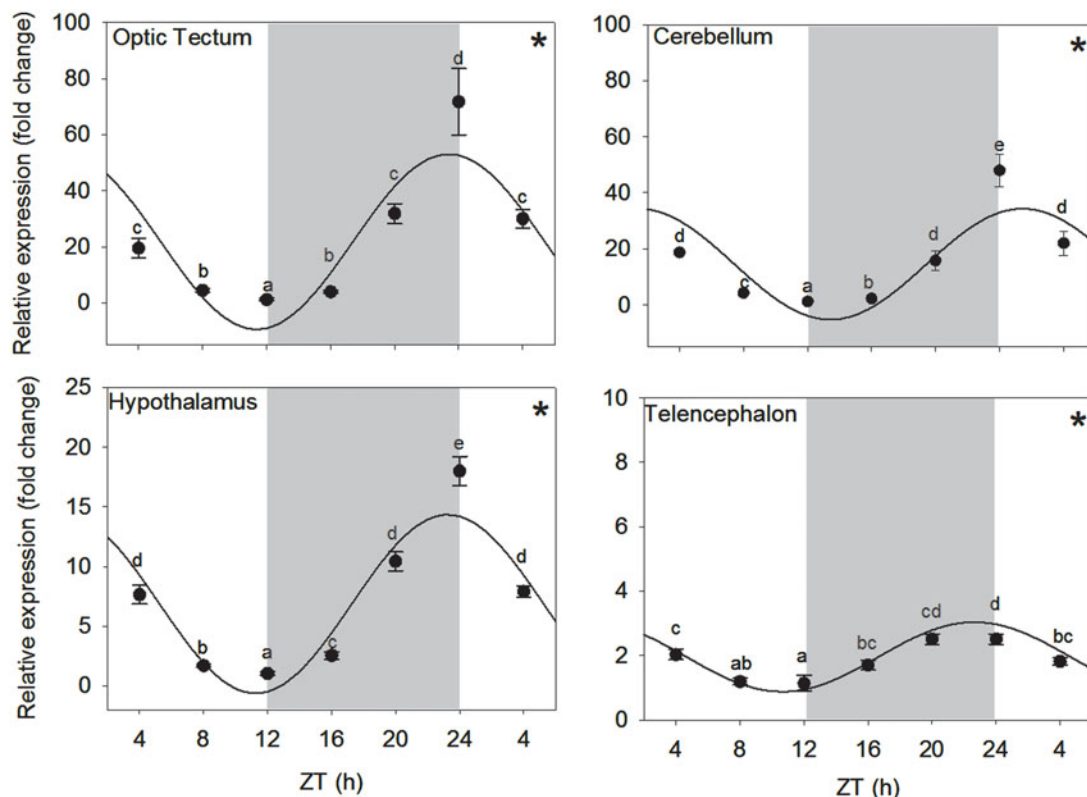


FIGURE 6. Daily profiles of *gper1b* expression in brain of goldfish. The ZT 0 was defined as the time of the lights on. Data obtained by qRT-PCR are shown as the mean ± SEM ( $n=6$ ) in relative units ( $\Delta\Delta C_t$  method). When significant (ANOVA  $p < 0.05$ ), differences among groups (SNK test) are indicated by different letters. The sinusoidallines represent the periodic sinusoidal functions determined by the least squares method. \*Significant cosinor analysis.

Springer & Mednick, 1984, 1985), till now it has not been demonstrated that it works as a master clock. Indeed, rhythmic melatonin release is maintained in fish lacking the ventral brain (Noche et al., 2011), what could be explained because the pineal in fish posses an endogenous clock (Falcón, 1999). In goldfish, the nucleus homologous to mammalian SCN, NAPv, exhibits *gper1b* expression, but the amount of messengers did not appear to exceed that observed in many surrounding structures as reported in zebrafish (Moore & Whitmore, 2014; Weger et al., 2013) and *clock* in rainbow trout (Mazurais et al., 2000). The role of the different encephalic nuclei that express *gper1b* that have been here described, as well as the role of the pineal gland in goldfish circadian organization remain to be elucidated. The nature of *gper1b*-expressing cells has to be studied in order to understand the role of endogenous clocks in these tissues (most of them neuroendocrine or endocrine tissues). Moreover, it would be interesting to investigate if *gper1b*-expressing cells are at time target of hormonal signals (melatonin, cortisol) that could synchronize endogenous clocks.

While *gper1b* mRNAs were found in many brain regions, surprisingly, in goldfish it did not seem to be particularly expressed in the pretectal region, an area that receives abundant afferents from the retina, but also shows considerable variation in teleosts

(Fraley & Sharma, 1984; Springer & Mednick, 1984, 1985). This lack of expression correlates well with the observation in zebrafish that *per3* was not expressed in the pretectal area. This is in contrast with the situation in rainbow trout showing that one of the nuclei exhibiting highest clock expression is the posterior pretectal nucleus, a plesiomorphic structure that exists only in fish lacking a glomerulosus nucleus, such as salmonids (Mazurais et al., 2000).

In teleost, the habenula is connected to the pineal gland (Falcón, 1999; Yáñez et al., 2009), which is one of the most established circadian oscillators in teleosts (Falcón, 1999). The first report that showed circadian clock genes rhythmicity in habenular nuclei was the study of Watanabe et al. (2012) in the flounder. More recently, Weger et al. (2013) have reported clock genes rhythms in this brain area of zebrafish. Present results in goldfish confirm a relevant presence of clock genes (*gper1b*) in the habenula of fish. These nuclei have been demonstrated to have circadian firing rhythms and photic responsiveness in rodents (Zhao & Rusak, 2005), to show clock genes rhythmicity (Guilding et al., 2010) and to be connected directly to the retina and the SCN in mammals (Qu et al., 1996).

In the present study, the torus longitudinalis, the periventricular gray zone of the optic tectum and the valvula cerebelli of goldfish show differential light/dark

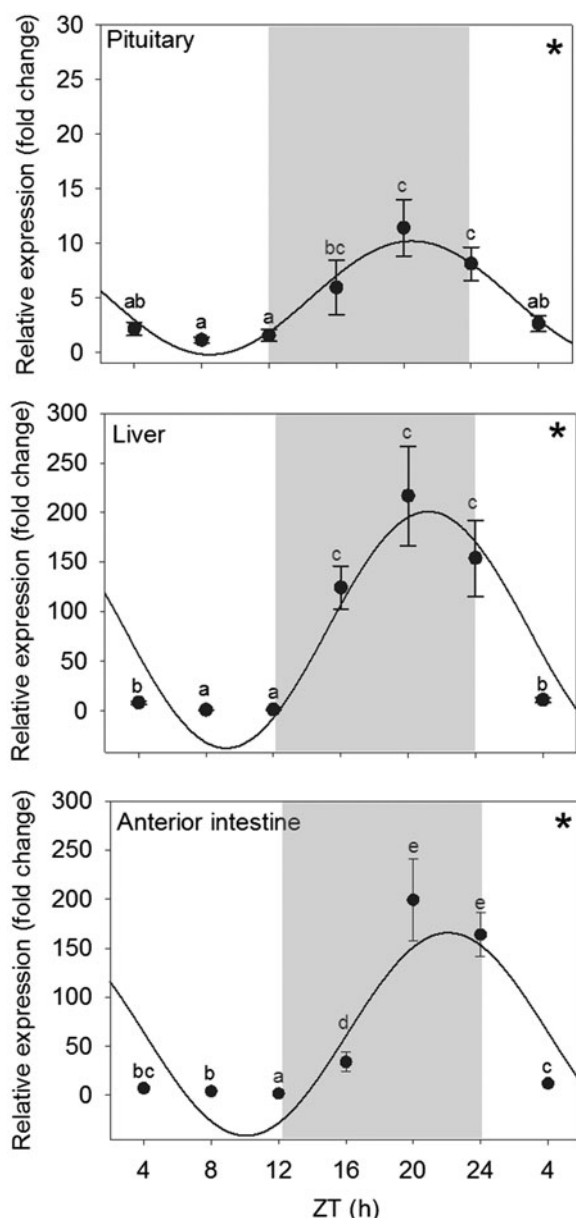


FIGURE 7. Daily profiles of *gper1b* expression in peripheral tissues of goldfish. The ZT 0 was defined as the time of the lights on. Data obtained by qRT-PCR are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n=6$ ) in relative units ( $\Delta\Delta Ct$  method). When significant (ANOVA  $p < 0.05$ ), differences among groups (SNK test) are indicated by different letters. The sinusoidal lines represent the periodic sinusoidal functions determined by the least squares method. \*Significant cosinor analysis.

*gper1b* expression in agreement with recent results obtained in zebrafish that also showed similar circadian differences in clock genes expression in these areas (Moore & Whitmore, 2014; Weger et al., 2013). In the rainbow trout, *clock* is expressed in cells of the periventricular gray zone of the optic tectum (Mazurais et al., 2000). In addition, these areas have been reported to be intercommunicated and to be connected with the retina (Folgueira et al., 2007; Mazurais et al., 2000; Yáñez et al., 2009), and then, being able to receive photoperiodic information.

TABLE 3. Parameters defining the clock gene expression rhythms in brain and peripheral tissues of goldfish.

	ACROPHASE (CT, hour)	AMPLITUDE (fold change)
Telencephalon	22.6 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.2
Hypothalamus	23.3 $\pm$ 0.3	7.5 $\pm$ 0.7
Cerebellum	0.1 $\pm$ 0.4	19.8 $\pm$ 2.4
Optic tectum	23.4 $\pm$ 0.4	31.3 $\pm$ 3.9
Pituitary	20.5 $\pm$ 0.5	5.2 $\pm$ 0.8
Liver	20.2 $\pm$ 0.4	119.4 $\pm$ 14.4
Anterior intestine	21.1 $\pm$ 0.4	103.3 $\pm$ 13.3

All parameters from sinusoidal function are expressed as the value  $\pm$  SE. Rhythms were significant in all studied tissues (cosinor analysis SE (A)/(A)  $< 0.3$ , and ANOVA,  $p < 0.05$ ).

The mapping obtained for *gper1b* gene in goldfish match well with targets for different peptides and hormones that are candidates to modulate the clock in teleosts. Thus, melatonin receptors are co-expressed with *clock* mRNAs in some brain regions in trout (Mazurais et al., 2000), and probably also co-expressed with *gper1b* in goldfish, as an outcome of comparing present results with the previous reported melatonin receptor distribution by binding assay in the brain of this species (Iigo et al., 1994). The torus longitudinalis, the optic tectum and the valvula cerebelli possess orexin receptors in goldfish (Facciolo et al., 2010, 2012), and the orexinergic system modulates clock gene expression in this teleost (Nisembaum et al., 2014). Besides, some of the locations that express *gper1b* gene in goldfish are reported to be part of the NPY system (Vecino et al., 1994), which has been related to circadian regulation (Weber & Rea, 1997).

Studies using imaging techniques to analyze clock genes distribution in the peripheral oscillators are scarce in vertebrates (García-Fernández et al., 2007; Girotti et al., 2009; Sládek et al., 2007), and nothing is known in fish. The *in situ* hybridization in peripheral locations (pituitary, liver and anterior intestine) of goldfish showed a huge presence of *gper1b* transcripts. In the pituitary a wide distribution of *gper1b* transcripts occurs in both, pars intermedia and pars distalis. In mammals, it has been proposed that adenohypophyseal cells are able to measure time, as far as they contain the molecular machinery of the clock (Abe et al., 2002). It is known that the majority of the hypophyseal hormones show a circadian expression pattern and are regulated by photoperiod and melatonin in teleosts (Ayson & Takemura, 2006; Falcón, 1999). Moreover, it has been proposed that circadian clocks in endocrine glands could play a significant role in altering these glands sensitivity to specific stimuli through the day (Kalsbeek & Fliers, 2013). The knowledge of the different cell types that express clock genes might be useful to elucidate the regulation of daily rhythms in pituitary hormones.

Similarly, to investigate which cells express *gper1b* in the liver and the intestine could help to understand the cross-talking between the endocrine digestive tissues

and circadian system. Present data demonstrate, for the first time in fish, a wide *gper1b* presence in the liver and the anterior intestine by *in situ* hybridization. This clock gene is expressed in almost all the hepatic cells. The cell types that are *gper1b*-positive in the anterior intestine (in the mucosa, submucosa and to a lesser extent in the muscular layer) remained unsolved, and further studies co-localizing clock genes and gastrointestinal peptides are required. These results obtained by *in situ* hybridization in peripheral (and also central) structures, also highlight an interesting issue yet unsolved. In zebrafish, a variety of cell lines from peripheral tissues show circadian clock genes rhythmicity *in vitro* (Whitmore et al., 1998). The presence of a clock molecular machinery is probable ubiquitous, but the highly different abundance of *gper1b* gene in different locations of the organism (at least in goldfish) suggest that maybe not all the cells act as endogenous circadian clocks under physiological *in vivo* conditions.

The acrophase of *gper1b* at the end of the dark phase in both central and peripheral tissues of goldfish coincides with the previously reported for *gper1a* in this same species (Nisembaum et al., 2012). This anticipation to light arrival is a common feature for *per1* expression in most studied fish species, as zebrafish brain and peripheral tissues (Pando et al., 2001), brain and liver of reef fish (Park et al., 2007) and Atlantic salmon (Huang et al., 2010). Moreover in goldfish central and peripheral tissues, *gper1a* also anticipates food arrival under constant light and scheduled feeding (Feliciano et al., 2011; Nisembaum et al., 2012). However, peripheral tissues are more sensitive to feeding cues in goldfish (Feliciano et al., 2011; Nisembaum et al., 2012), as it occurs in mammals (Albrecht, 2012). This higher sensitivity to food signals could explain the striking results obtained for the amplitudes of *gper1b* rhythms in the liver and anterior intestine, which are much higher than in the rest of the tissues analyzed. Nevertheless, *in situ* hybridization results show strong day/night differences in *gper1b* expression in some hypothalamic nuclei, as NAPv, NLTP, NPPv or NPGl (Figure 2), that could be masked in the 24 h rhythm observed by RT-qPCR due to the use of the whole hypothalamus (all the nuclei, with or without *gper1b* rhythm, are analyzed together). In fact, the regions of the brain with higher amplitudes match with the most homogenous regions (cerebellum and optic tectum).

The acrophases of *gper1b* daily expression rhythms in brain and peripheral locations are coincident in time, or slightly advanced in the peripheral tissues, suggesting that endogenous clocks are in phase at these locations. If the circadian system functions in a hierarchical manner, in fish, as in mammals, is to date under debate, as till now a master clock has not been found in these vertebrates. The *gper1b* rhythm observed in peripheral goldfish tissues may well not be the result of the synchronizing action of a master clock located in

central areas. In this sense, in zebrafish is well known that all the cells are directly light-sensitive on *in vitro* culture (Whitmore et al., 1998), supporting a non-central dependent synchronization to light of peripheral clocks. In goldfish a direct light sensitivity of peripheral tissues is not probably (Nisembaum et al., 2012), however other signals could act as endogenous cues for peripheral oscillators. In this sense, a hormonal modulation of clock genes in some tissues of goldfish has been recently reported (Nisembaum et al., 2014). However, nowadays the mechanism by which hormones modifies endogenous oscillators is unknown. Present work is the first approximation to identify if cells that are targets for these hormones are the same that have the molecular machinery of the clock.

Taken together, the present results further document the presence of numerous central and peripheral sites (particularly the liver and the intestine) of *per1b* expression that exhibits daily rhythms with the highest expression during the night. How is organized the complex circadian system in fish remains unknown, but what seems clear from this study and others previous is that the nucleus anatomically homologous to mammalian SCN is not (in contrast to mammals) the master clock in fish. This is not really surprising given that the SCN progressively emerged during evolution in parallel with the loss of direct sensitivity of pinealocytes (Falcón, 1999). If higher amplitudes of *gper1b* rhythms in liver and anterior intestine could reflect an independent synchronization of central and peripheral oscillators remain unknown.

## DECLARATION OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper. This study was supported by the Spanish MINECO (AGL2013-46448-C3-2-R). A. Sánchez-Bretaña is a predoctoral fellowship from the Spanish MINECO.

## REFERENCES

- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, et al. (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci.* 22:350–56.
- Albrecht U. (2012). Timing to perfection: The biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron.* 74:246–60.
- Amir S, Lamont EW, Robinson B, Stewart J. (2004). A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci.* 24:781–90.
- Ayson FG, Takemura A. (2006). Daily expression patterns for mRNAs of GH, PRL, SL, IGF-I and IGF-II in juvenile rabbitfish, *Siganus guttatus*, during 24-h light and dark cycles. *Gen Comp Endocrinol.* 149:261–68.
- Brown SA, Zumbrunn G, Fleury-Olela F, et al. (2002). Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol.* 12:1574–83.
- Buhr ED, Takahashi JS. (2013). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol.* 217:3–27.



- Cermakian N, Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. (2000). Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function. *Proc Natl Acad Sci.* 97:4339–44.
- Davie A, Minghetti M, Migaud H. (2009). Seasonal variations in clock-gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Chronobiol Int.* 26:379–95.
- Del Pozo A, Vera LM, Sánchez JA, Sánchez-Vázquez FJ. (2012). Molecular cloning, tissue distribution and daily expression of *cry1* and *cry2* clock genes in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp Biochem Physiol A.* 163:364–71.
- Duggleby RG. (1981). A nonlinear regression program for small computers. *Anal Biochem.* 110:9–18.
- Escobar S, Servili A, Espigares F, et al. (2013). Expression of kisspeptins and kiss receptors suggests a large range of functions for kisspeptin systems in the brain of the European sea bass. *PLoS One.* 8:e70177.
- Facciolo RM, Crudo M, Giusi G, Canonaco M. (2010). GABAergic influences on ORX receptor-dependent abnormal motor behaviors and neurodegenerative events in fish. *Toxicol Appl Pharmacol.* 243:77–86.
- Facciolo RM, Crudo M, Zizza M, et al. (2012).  $\alpha$  GABA(A) subunit-orexin receptor interactions activate learning/motivational pathways in the goldfish. *Behav Brain Res.* 234:349–56.
- Falcón J. (1999). Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog Neurobiol.* 58:121–62.
- Feliciano A, Vivas Y, de Pedro N, et al. (2011). Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J Biol Rhythms.* 26: 24–33.
- Folgueira M, Sueiro C, Rodríguez-Moldes I, et al. (2007). Organization of the torus longitudinalis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): An immunohistochemical study of the GABAergic system and a DiI tract-tracing study. *J Comp Neurol.* 503:348–70.
- Fraleley SM, Sharma SC. (1984). Topography of retinal axons in the diencephalon of goldfish. *Cell Tissue Res.* 238:529–38.
- García-Fernández JM, Alvarez-López C, Cernuda-Cernuda R. (2007). Cytoplasmic localization of mPER1 clock protein isoforms in the mouse retina. *Neurosci Lett.* 419:55–8.
- Gerstner JR, Vander Heyden WM, Lavaute TM, Landry CF. (2006). Profiles of novel diurnally regulated genes in mouse hypothalamus: Expression analysis of the cysteine and histidine-rich domain-containing, zinc-binding protein 1, the fatty acid-binding protein 7 and the GTPase, ras-like family member 11b. *Neuroscience.* 139:1435–48.
- Girotti M, Weinberg MS, Spencer RL. (2009). Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: System-wide shifts in response to a restricted feeding schedule. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296:E888–97.
- Guilting C, Hughes ATL, Piggins HD. (2010). Circadian oscillators in the epithalamus. *Neuroscience.* 169:1630–9.
- Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES. (2007). Circadian clocks: Regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol.* 195:187–98.
- Huang T-S, Ruoff P, Fjellidal PG. (2010). Effect of continuous light on daily levels of plasma melatonin and cortisol and expression of clock genes in pineal gland, brain, and liver in atlantic salmon postsmolts. *Chronobiol Int.* 27:1715–34.
- Hur S-P, Takeuchi Y, Itoh H, et al. (2012). Fish sleeping under sandy bottom: Interplay of melatonin and clock genes. *Gen Comp Endocrinol.* 177:37–45.
- Iigo M, Kobayashi M, Ohtani-Kaneko R, et al. (1994). Characteristics, day-night changes, subcellular distribution and localization of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Brain Res.* 644:213–20.
- Kalsbeek A, Fliers E. (2013). Daily regulation of hormone profiles. *Handb Exp Pharmacol.* 217:185–226.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  methods. *Methods.* 25:402–8.
- Martín-Robles AJ, Whitmore D, Sánchez-Vázquez FJ, et al. (2012). Cloning, tissue expression pattern and daily rhythms of *Period1*, *Period2*, and *Clock* transcripts in the flatfish Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *J Comp Physiol B.* 182: 673–85.
- Mazurais D, Le Dréan G, Brierley I, et al. (2000). Expression of clock gene in the brain of rainbow trout: Comparison with the distribution of melatonin receptors. *J Comp Neurol.* 422: 612–20.
- Moore HA, Whitmore D. (2014). Circadian rhythmicity and light sensitivity of the zebrafish brain. *PLoS One.* 9:e86176.
- Mracek P, Santoriello C, Idda ML, et al. (2012). Regulation of *per* and *cry* genes reveals a central role for the D-Box enhancer in light-dependent gene expression. *PLoS One.* 7:e51278.
- Namihira M, Honma S, Abe H, et al. (1999). Daily variation and light responsiveness of mammalian clock gene, *Clock* and *BMAL1*, transcripts in the pineal body and different areas of brain in rats. *Neurosci Lett.* 267:69–72.
- Nisembaum LG, Velarde E, Tinoco AB, et al. (2012). Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol Int.* 29: 665–73.
- Nisembaum LG, de Pedro N, Delgado MJ, et al. (2014). Orexin as an input of circadian system in goldfish: Effects on clock gene expression and locomotor activity rhythms. *Peptides.* 52:29–37.
- Noche RR, Lu P-N, Goldstein-Kral L, et al. (2011). Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain. *BMC Neurosci.* 12:7–19.
- Pando MP, Pinchak AB, Cermakian N, Sassone-Corsi P. (2001). A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. *Proc Natl Acad Sci.* 98: 10178–83.
- Park J-G, Park Y-J, Sugama N, Kim S-J, Takemura A. (2007). Molecular cloning and daily variations of the *Period* gene in a reef fish *Siganus guttatus*. *J Comp Physiol A.* 193:403–11.
- Partch CL, Green CB, Takahashi JS. (2014). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.* 24:90–9.
- Peter RE, Gill VE. (1975). A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of the goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol.* 159:69–101.
- Qu T, Dong K, Sugioaka K, Yamadori T. (1996). Demonstration of direct input from the retina to the lateral habenular nucleus in the albino rat. *Brain Res.* 709:251–8.
- Rink E, Wullimann MF. (2004). Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res.* 1011:206–20.
- Shieh K-R, Yang S-C, Lu X-Y, et al. (2005). Diurnal rhythmic expression of the rhythm-related genes, *rPeriod1*, *rPeriod2*, and *rClock*, in the rat brain. *J Biomed Sci.* 12:209–17.
- Sládek M, Rybová M, Jindráková Z, et al. (2007). Insight into the circadian clock within rat colonic epithelial cells. *Gastroenterology.* 133:1240–9.
- Springer AD, Mednick AS. (1984). Selective innervation of the goldfish suprachiasmatic nucleus by ventral retinal ganglion cell axons. *Brain Res.* 323:293–6.
- Springer AD, Mednick AS. (1985). A quantitative study of the relative contribution of different retinal sectors to the innervation of various thalamic and pretectal nuclei in goldfish. *J Comp Neurol.* 242:369–80.
- Tomioka K, Matsumoto A. (2010). A comparative view of insect circadian clock systems. *Cell Mol Life Sci.* 67:1397–406.
- Travníková-Bendová Z, Cermakian N, Reppert SM, Sassone-Corsi P. (2002). Bimodal regulation of *mPeriod* promoters by CREB-dependent signaling and *CLOCK/BMAL1* activity. *Proc Natl Acad Sci.* 99:7728–33.

- Vallone D, Gondi SB, Whitmore D, Foulkes NS. (2004). E-box function in a period gene repressed by light. *Proc Natl Acad Sci.* 101:4106–11.
- Vecino E, Perez MT, Ekström P. (1994). In situ hybridization of neuropeptide Y (NPY) mRNA in the goldfish brain. *Neuroreport.* 6:127–31.
- Velarde E, Haque R, Iuvone PM, et al. (2009). Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of period and cryptochrome transcripts in retina, liver, and gut. *J Biol Rhythms.* 24:104–13.
- Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, et al. (2001). Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci.* 13:1190–6.
- Wang H. (2008). Comparative analysis of period genes in teleost fish genomes. *J Mol Evol.* 67:29–40.
- Watanabe N, Itoh K, Mogi M, et al. (2012). Circadian pacemaker in the suprachiasmatic nuclei of teleost fish revealed by rhythmic period2 expression. *Gen Comp Endocrinol.* 178:400–7.
- Weber ET, Rea MA. (1997). Neuropeptide Y blocks light-induced phase advances but not delays of the circadian activity rhythm in hamsters. *Neurosci Lett.* 231:159–62.
- Weger M, Weger BD, Diotel N, et al. (2013). Real-time in vivo monitoring of circadian E-box enhancer activity: A robust and sensitive zebrafish reporter line for developmental, chemical and neural biology of the circadian clock. *Dev Biol.* 380: 259–73.
- Whitmore D, Foulkes NS, Strähle U, Sassone-Corsi P. (1998). Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat Neurosci.* 1:701–7.
- Yamamoto T, Nakahata Y, Tanaka M, et al. (2005). Acute physical stress elevates mouse period1 mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J Biol Chem.* 280:42036–43.
- Yáñez J, Busch J, Anadón R, Meissl H. (2009). Pineal projections in the zebrafish (*Danio rerio*): Overlap with retinal and cerebellar projections. *Neuroscience.* 164: 1712–20.
- Zhao H, Rusak B. (2005). Circadian firing-rate rhythms and light responses of rat habenular nucleus neurons *in vivo* and *in vitro*. *Neuroscience.* 132:519–28.
- Ziv L, Levkovitz S, Toyama R, et al. (2005). Functional development of the zebrafish pineal gland: Light-induced expression of period2 is required for onset of the circadian clock. *J Neuroendocrinol.* 17:314–20.

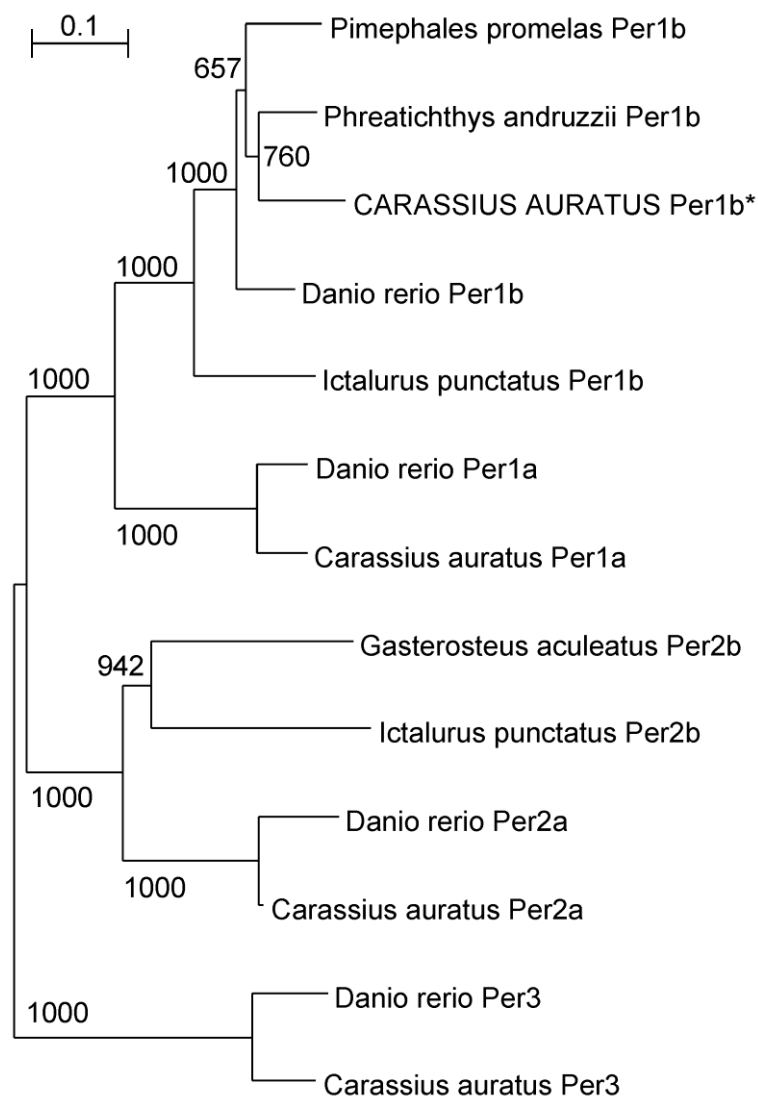
Supplementary material available online

## **Supplementary Online Material**

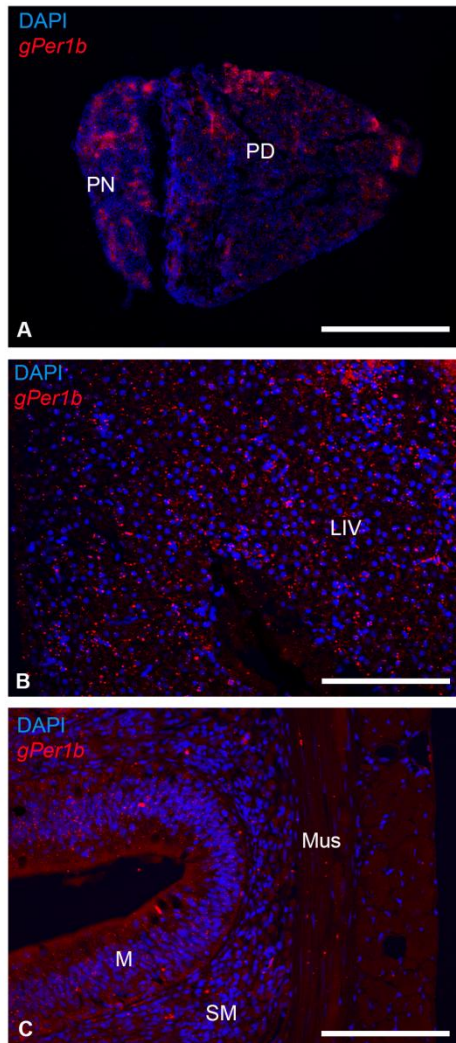
Anatomical distribution and circadian daily profile of *gper1b* gene expression in brain  
and peripheral structures of goldfish

(*Carassius auratus*).

Aída Sánchez-Breñaño, Marie-M. Gueguen, Joel Cano-Nicolau, Olivier Kah, Ángel L. Alonso-Gómez, María J. Delgado, Esther Isorna.

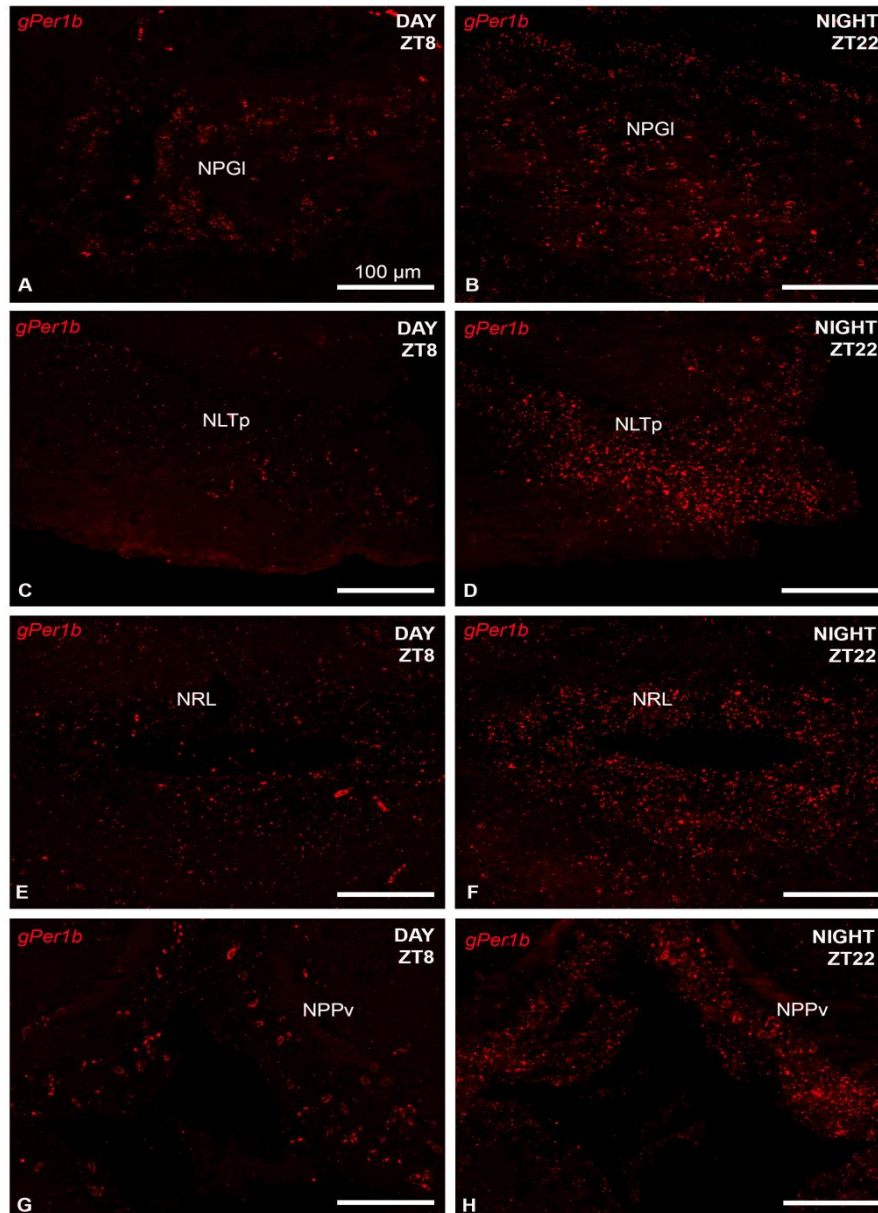


**S1. Phylogenetic analysis of goldfish *per1b*.** Only partial peptide sequences aligned with goldfish sequences were used to generate the dendrogram. Tree was generated by de Neighbor-Joining method using ClustalX ver. 2.1. Branch length is proportional to evolutionary distance. Bar on the left-top indicates 0.1 distance (10 changes every 100 amino acids). Number in branches indicates the robustness of each internal node after 1000 bootstrap repetitions. "Accession number for each species is given with the species name". In case of nucleotide sequences, they are translated to corresponding amino acids. Accession numbers: Carassius auratus Per1a, ABU93788.1; Carassius auratus Per2a ABU93787.1; Carassius auratus Per3, ABU93789.1; Danio rerio Per1a, AAI63543.1; Danio rerio Per1b, AAI63718.1; Danio rerio Per2a, AAI63549.1; Danio rerio Per3, AAI62472.1; Gasterosteus aculeatus Per2b, ENSGACP00000007489 Ensembl database; Ictalurus punctatus Per1b, JT416004.1; Ictalurus punctatus Per2b, JT467119.1; Phreatichthys andruzzii Per1b, ADL62689.1; Pimephales promelas Per1b, DT281771.1 and DT112397.1.

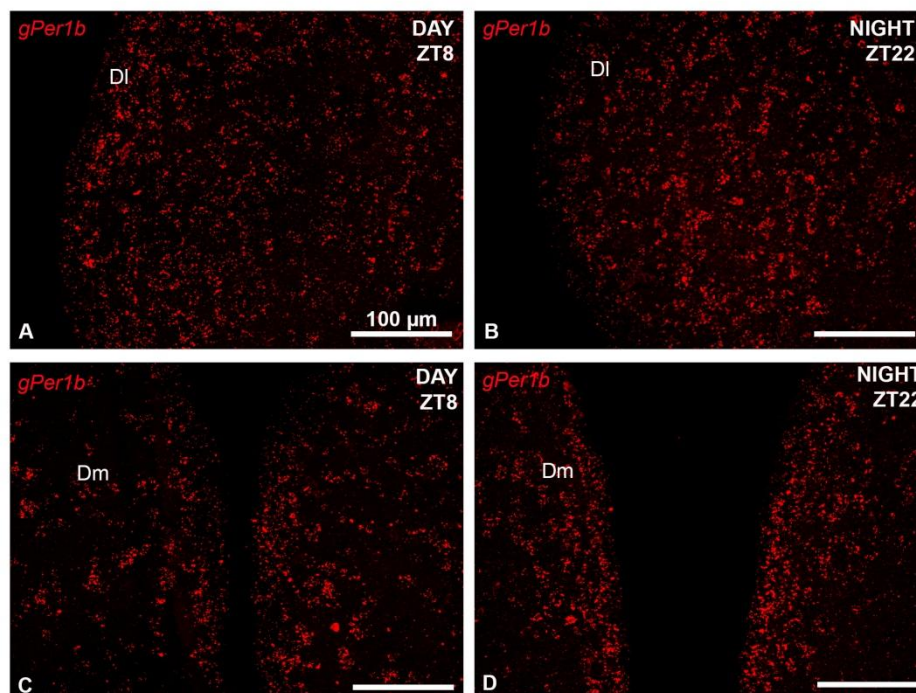


**S2. Distribution of *gper1b* expressing cells in peripheral locations of goldfish.** (A) Representative section of *gper1b* expressing cells in the pituitary. (B) Representative section of *gper1b* positive cells in the liver. (C) Representative section of *gper1b* expression in the anterior intestine layers. LIV, liver; M, mucosa; Mus, muscular layer; PD, pars distalis; PI, pars intermedia; SM, submucosa.





**S3. Day/night expression of *gper1b* in the hypothalamus of goldfish.** Expression of *gper1b* mRNA at daytime (ZT8, figures on the left) and nighttime, in the absence of light (ZT22, figures on the right) in the lateral portion of the preglomerular nucleus (A, B), the posterior part of the lateral tubular nucleus (C, D), the nucleus of the lateral recess (E, F), the posterior periventricular nucleus (G, H), the preoptic nucleus and the anterior periventricular nucleus (I, J). NLTp posterior part of the lateral tubular nucleus; NPGI lateral portion of the preglomerular nucleus; NPPv posterior periventricular nucleus; NRL nucleus of the lateral recess.



**S4. Day/night expression of *gper1b* in the telencephalon of goldfish.** Expression of *gper1b* mRNA at daytime (ZT8; A, C) and at nighttime (ZT22; B, D). DI, lateral portion of the dorsal telencephalon; Dm medial portion of the dorsal telencephalon.



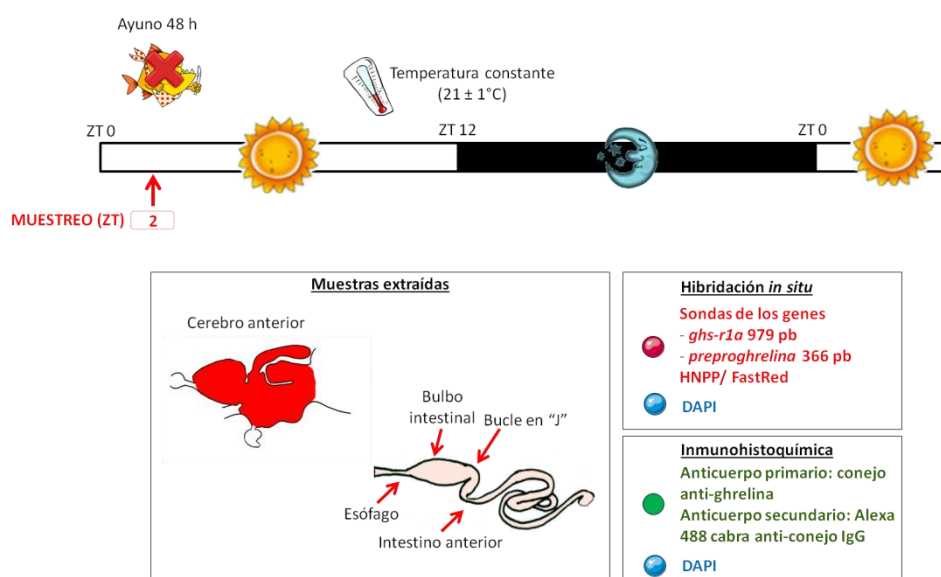
## 1.2. Distribución anatómica y perfil diario de expresión de ghrelina y el receptor de ghrelina GHS-R1 en cerebro y tracto gastrointestinal del carpín (*Carassius auratus*).

*Anatomical distribution and daily expression of ghrelin and ghs-r1 ghrelin receptor in brain and gastrointestinal tract of goldfish (Carassius auratus). (2015) PLOS One. 10(10):e0141043*

### DISEÑOS EXPERIMENTALES

#### 1. Estudio de la distribución anatómica de los genes del receptor de la ghrelina *ghs-r1a* y *preproghrelina*, así como del propio péptido en cerebro y tracto gastrointestinal del carpín.

Para el estudio anatómico del sistema ghrelinérgico del carpín, los animales se aclimataron durante 15 días. Los animales permanecieron en ayunas 48 h antes del experimento. El día del experimento los peces se anestesiaron con fenoxietanol (1 ml/l) y se fijaron con paraformaldehído al 4% a ZT 2 extrayéndose muestras de cerebro, y varias partes del intestino proximal descrito por Arcamone et al., 2009 (esófago, bulbo intestinal, bucle en “J” e intestino anterior). A continuación se llevó a cabo la hibridación *in situ* en todas las muestras con la sonda antisentido y sentido (control negativo) para los genes *ghs-r1a* y *preproghrelina*. Además, en una parte de las muestras se analizó la distribución anatómica de la propia ghrelina mediante inmunohistoquímica realizada con un anticuerpo primario específico anti- ghrelina humana previamente utilizado con éxito con el carpín (Kerbel and Unniappan, 2012) (Figura C1.3).

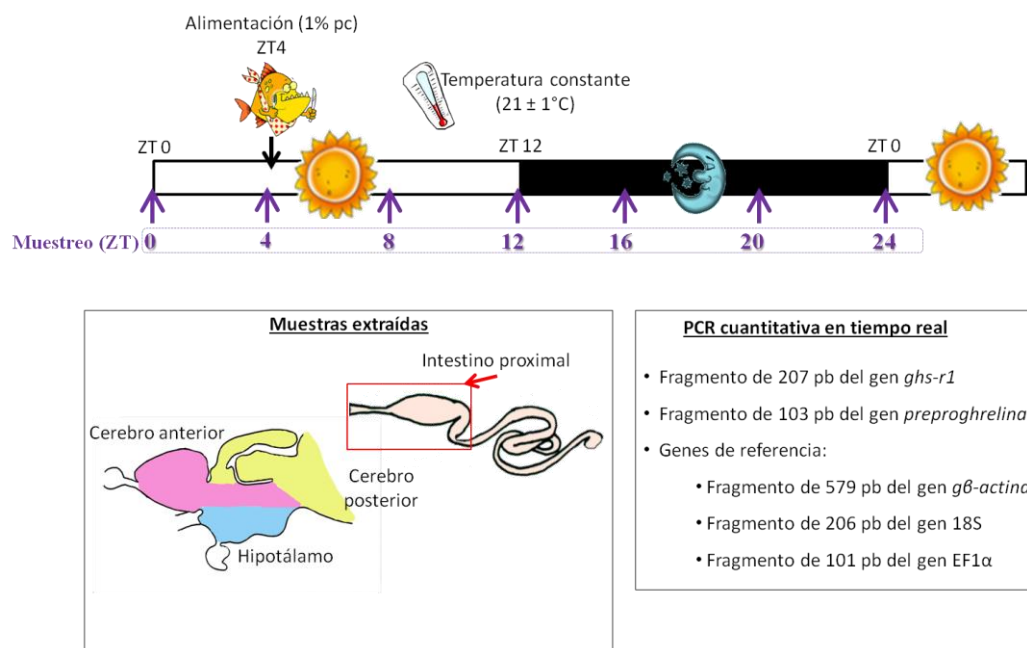


**Figura C1.3.** Diseño experimental del experimento para el estudio de la distribución anatómica de los genes *preproghrelina* y *ghs-r1a* y del péptido de ghrelina en encéfalo y órganos periféricos del carpín. Se tomaron muestras de cerebro anterior, esófago, bulbo intestinal, bucle en “J”, intestino anterior e

hígado de carpines mantenidos en condiciones de aclimatación en ayunas durante 48 h en ZT 2 (durante fase lumínica del fotociclo). La hibridación *in situ* se realizó mediante el uso de sondas sentido y antisentido de 979 pb del gen *ghs-r1a* y de 366 pb del gen *preproghrelina*. La inmunohistoquímica se realizó mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra ghrelina preparados en conejo que se revelaron con el anticuerpo secundario Alexa 488 cabra anti-conejo.

## 2. Estudio del patrón diario de expresión de los genes del receptor de la ghrelina *ghs-r1a* y *preproghrelina* en cerebro y tracto gastrointestinal del carpín.

Para el análisis del perfil diario de expresión de los genes de la ghrelina y su receptor 1, se realizó el protocolo descrito en la figura C1.4. Los animales se mantuvieron en condiciones de aclimatación con alimentación a ZT 4 durante 15 días. El día del experimento, los animales comieron con normalidad a ZT 4. Cada 4 h los peces se anestesiaron en MS-222 (0.175 g/l) y se sacrificaron para la obtención de las muestras de cerebro anterior (telencéfalo y diencéfalo sin hipotálamo), hipotálamo y cerebro posterior (mesencéfalo y rombencéfalo) e intestino proximal (incluyendo esófago, bulbo intestinal, bucle en “J” e intestino anterior). Las muestras fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su procesamiento. A continuación se llevó a cabo el análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real.



**Figura C1.4.** Diseño experimental del experimento para el estudio de la expresión diaria del gen *gper1b* en encéfalo y tracto gastrointestinal del carpín. Se tomaron muestras cada cuatro horas de telencéfalo, techo óptico, cerebelo, hipotálamo, hipófisis, intestino anterior e hígado de carpín para analizar la posible ritmicidad diaria de la expresión del gen *gper1b* mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizaron fragmentos parciales para *preproghrelina* y *ghs-r1* y los genes de referencia *gβ-actina*, *18S* y *EF1α*.

RESEARCH ARTICLE

# *In Situ* Localization and Rhythmic Expression of Ghrelin and *ghs-r1* Ghrelin Receptor in the Brain and Gastrointestinal Tract of Goldfish (*Carassius auratus*)

Aída Sánchez-Bretaña<sup>1</sup>✉, Ayelén M. Blanco<sup>1,2</sup>✉, Suraj Unniappan<sup>2</sup>, Olivier Kah<sup>3</sup>, Marie-M. Gueguen<sup>3</sup>, Juan I. Bertucci<sup>4</sup>, Ángel L. Alonso-Gómez<sup>1</sup>, Ana I. Valenciano<sup>1</sup>, Esther Isorna<sup>1</sup>, María J. Delgado<sup>1</sup>\*

**1** Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid, Spain, **2** Laboratory of Integrative Neuroendocrinology, Department of Veterinary Biomedical Sciences, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada, **3** Inserm (Research Institute for Health, Environment and Occupation, IRSET), SFR Biosit Université de Rennes 1, Rennes, France, **4** Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico Chascomús, Buenos Aires, Argentina

✉ These authors contributed equally to this work.

\* [mjdelgad@bio.ucm.es](mailto:mjdelgad@bio.ucm.es)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Sánchez-Bretaña A, Blanco AM, Unniappan S, Kah O, Gueguen M-M, Bertucci JI, et al. (2015) *In Situ* Localization and Rhythmic Expression of Ghrelin and *ghs-r1* Ghrelin Receptor in the Brain and Gastrointestinal Tract of Goldfish (*Carassius auratus*). PLoS ONE 10(10): e0141043. doi:10.1371/journal.pone.0141043

**Editor:** Juan Fuentes, Centre of Marine Sciences & University of Algarve, PORTUGAL

**Received:** July 29, 2015

**Accepted:** October 2, 2015

**Published:** October 27, 2015

**Copyright:** © 2015 Sánchez-Bretaña et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This collaborative research was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2013-46448-C3-2-R) to MJD, and partly by a Discovery Grant and Discovery Accelerator Supplement award from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, an Establishment grant from Saskatchewan Health Research Foundation and John R. Evans Leaders Fund from the Canada Foundation for

## Abstract

Ghrelin is a gut-brain peptide hormone, which binds to the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) to regulate a wide variety of biological processes in fish. Despite these prominent physiological roles, no studies have reported the anatomical distribution of *preproghrelin* transcripts using *in situ* hybridization in a non-mammalian vertebrate, and its mapping within the different encephalic areas remains unknown. Similarly, no information is available on the possible 24-h variations in the expression of *preproghrelin* and its receptor in any vertebrate species. The first aim of this study was to investigate the anatomical distribution of ghrelin and GHS-R1a ghrelin receptor subtype in brain and gastrointestinal tract of goldfish (*Carassius auratus*) using immunohistochemistry and *in situ* hybridization. Our second aim was to characterize possible daily variations of *preproghrelin* and *ghs-r1* mRNA expression in central and peripheral tissues using real-time reverse transcription-quantitative PCR. Results show ghrelin expression and immunoreactivity in the gastrointestinal tract, with the most abundant signal observed in the mucosal epithelium. These are in agreement with previous findings on mucosal cells as the primary synthesizing site of ghrelin in goldfish. Ghrelin receptor was observed mainly in the hypothalamus with low expression in telencephalon, pineal and cerebellum, and in the same gastrointestinal areas as ghrelin. Daily rhythms in mRNA expression were found for *preproghrelin* and *ghs-r1* in hypothalamus and pituitary with the acrophase occurring at nighttime. *Preproghrelin*, but not *ghs-r1a*, displayed a similar daily expression rhythm in the gastrointestinal tract with an amplitude 3-fold higher than the rest of tissues. Together, these results described for the first time in fish the mapping of *preproghrelin* and ghrelin receptor *ghs-r1a* in brain and gastrointestinal tract of goldfish, and provide the first evidence for a daily regulation of both



Innovation to SU. SU is a recipient of the Canadian Institutes of Health Research New Investigator Award. ASB and AMB are predoctoral fellows from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and Ministerio de Educación y Ciencia, respectively. JIB is a predoctoral fellow from the Argentinian Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, and a recipient of the Emerging Leaders of the Americas Program funded by the Government of Canada. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

genes expression in such locations, suggesting a possible connection between the ghrelinergic and circadian systems in teleosts.

## Introduction

Ghrelin, a peptide hormone mainly synthesized by the gut, was originally purified in 1999 by Kojima and colleagues [1]. The main site for the synthesis of ghrelin in all the vertebrates so far studied is the stomach or its equivalent [2], although gene expression of ghrelin by PCR shows a widespread tissue distribution, with low expression levels in peripheral tissues (apart from stomach) and brain in both mammals [3,4] and fish [5–7]. Imaging techniques have reported the presence of ghrelin gene and peptide in the brain [8] and gastrointestinal tract [9–12] of mammals. Similarly, ghrelin peptide has been localized by immunohistochemistry in the hypothalamus of goldfish [13] and in the gastrointestinal tract of goldfish (*Carassius auratus*) [14], sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [14], zebrafish (*Danio rerio*) [15], and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [16]. However, no studies to date have reported the anatomical distribution of the *preproghrelin* transcripts using *in situ* hybridization in a non-mammalian vertebrate, and its mapping within the different encephalic areas remains unknown.

Ghrelin is suggested to have a key role in energy balance regulation by promoting food intake, carbohydrate utilization and adiposity [17,18], and other physiological processes [19,20]. A unique aspect of this peptide is the presence of a posttranslational acyl modification catalysed by a recently discovered member of the membrane-bound O-acyltransferase family, named ghrelin O-acyl transferase [21,22]. This modification is essential for most of the bioactivity of the peptide, enabling the binding to its receptor, the G protein-coupled growth hormone secretagogue receptor (GHS-R). In contrast to mammals and other tetrapods with only one GHS-R gene, ancestral teleost underwent a genome duplication, and two paralog genes (GHS-R1 and GHS-R2) have been identified in otophysi teleosts [23]. Particularly, goldfish has experienced a tetraploidization, and four subtypes of GHS-Rs have been described and characterized in this teleost, named GHS-R1a1, GHS-R1a2, GHS-R2a1, and GHS-R2a2 [23]. In addition, each one of these receptor subtypes presents a type 'b' isoform obtained by alternative mRNA splicing. Among all of these different GHS-R, the GHS-R1a has been widely studied in vertebrates in terms of structure, tissue abundance, mechanism of action, dynamics and regulation, and seems to be involved in many of the physiological actions of ghrelin [3,24,25]. Nevertheless, little information is available about its anatomical location and distribution. In this sense, GHS-R1a has been localized in the mammalian brain [26–28], but no neuroanatomic mapping using imaging techniques has been performed in the brain of non-mammalian vertebrates. Among fishes, the distribution of ghrelin receptor in the gastrointestinal tract has been described only in zebrafish [15].

Most behaviour and physiology of living organisms follow daily rhythms due to the presence of endogenous clocks that synchronize biological processes to the 24-h light/dark cycle, enabling them to anticipate periodic changes in the environment. A growing interest in the relationships between energy balance and the circadian system has occurred in the last years. In fact, daily oscillations have been found in fish for many hormones involved in food intake regulation and metabolism, including neuropeptide Y (NPY) [29] and leptin [30]. In relation with the ghrelinergic system, only one study carried out in humans described the 24-h secretion profile of ghrelin, showing a circadian oscillation of this peptide with higher levels of

circulating ghrelin during the night [31]. However, no information is available about the possible 24-h variations in the expression of this hormone and its receptor in vertebrates.

Goldfish is a member of the teleostean Cyprinidae family and has been widely used for studying the hormonal regulation of feeding in fish [32,33]. The biological activities of ghrelin have been previously examined in this teleost, [34–37] but, despite the growing interest and importance of the ghrelinergic system, no studies have reported a brain mapping of the elements composing this system in fish, and nothing is known about its possible rhythmic expression. Therefore, the aim of the present study was first, to investigate the anatomical distribution of ghrelin and the ghrelin receptor subtype GHS-R1a in the brain and gastrointestinal tract of goldfish by using immunohistochemistry and *in situ* hybridization techniques. We also characterized the daily profile of *preproghrelin* and *ghs-r1* mRNA expression in both central and peripheral tissues using RT-qPCR.

## Material and Methods

### Ethics statement

All procedures carried out in France were conducted in accordance with the guidelines of Ethical Committee at our institutions (University of Rennes 1, CNRS and INSERM) and in accordance with European Union regulations concerning the protection of experimental animals (Directive 86/609/EEC). The protocols were approved by the Ethical Committee CREEA (Comité Rennais d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale) and performed under the supervision of authorized investigators (Permit number: EEA B-35-040). The study conducted in Canada strictly followed the regulations of the Canadian Council for Animal Care and were approved by the University of Saskatchewan Animal Research Ethics Board (Protocol # 2012–0082). The euthanasia was performed by deep anesthesia and all efforts were made to minimize suffering.

### Animals, experimental designs and sampling

For the anatomical studies, goldfish ( $2.0 \pm 0.5$  g) obtained from a local supplier (Rennes, France) were maintained in 60 l aquaria with filtered and aerated fresh water ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) under a 12 h light: 12 h darkness (12L:12D) photoperiod (lights on at 9 AM). Fish were daily fed at *zeitgeber* time 2 (ZT-2, or 11 AM, as ZT-0 corresponds to lights-on) with food pellets (1% body weight; Novo GranoMix, JBL, GmbH & Co., Neuhofen, Germany). Goldfish were fasted for 48 h, and at ZT-2 of the experimental day were anesthetized with phenoxyethanol 1 ml/l (ICN Biomedicals Inc., Irvine, CA, USA) and sacrificed. Then, fish were immersed overnight in 4% paraformaldehyde diluted in 0.1 M sodium phosphate buffer with saline (PBS, pH 7.4). The following day, the brain and the gastrointestinal tract (esophagus, intestinal bulb, j-loop and anterior intestine) were removed and post-fixed 3 h in the same solution. Then, the samples were cryoprotected with 30% sucrose (MP Biomedical, LLC, Illkirch, France) overnight, included in the frozen section medium Richard-Allan Scientific<sup>TM</sup> Neg-50 (Thermo Shandon Scientific, Cheshir, UK) and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

For the study of daily changes in gene expression, goldfish ( $22 \pm 8$  g) obtained from a commercial supplier (Aquatic Imports, Calgary, Alberta, Canada) were maintained in 200 L aquaria with filtered and aerated fresh water ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Fish were maintained under a 12L:12D photoperiod (lights on at 7 AM) and daily fed at ZT-4 with a commercial pellet diet (1% body weight; Martin Profishent, Ontario, Canada). The day of the experiment, fish were sacrificed in 4 h intervals (6 fish/sampling time) throughout a complete 24-h cycle beginning at ZT-0. Fish were randomly collected from two different tanks (21 fish/tank). Food was offered as scheduled the day of the experiment. Once sacrificed, samples of forebrain (including



**Table 1. Accession numbers of genes and primer sequences used in this study.**

Target gene	GenBank Accession number	Primer sequences 5' → 3'	Product (bp)	Application
<i>preproghrelin</i>	AF454389.1	F GCAGCCATTGAGAGTGTGT	366	Riboprobe synthesis
		R CAGAATTCAAGTGGCGAATC		
		F ATTCAGAGTGTGTGCGTA	103	RT-qPCR
		R AGGAAAGAGCACATAAGA		
<i>ghs-r1a</i>	AB504275 ( <i>ghs-r1a1</i> ) AB504276 ( <i>ghs-r1a2</i> )	F GAACCGGTCCAAGTGTTCCT	979	Riboprobe synthesis
		R AAGTTTGCAAGCTGCCATCC		
<i>ghs-r1</i>	AB504275 ( <i>ghs-r1a1</i> ) AB504276 ( <i>ghs-r1a2</i> )	F ATTCGAGCACCCGGTCAACA	207	RT-qPCR
		R TCCAGGGGCATGCAGAGAAA		
<i>β-actin</i>	AB039726.2	F CTACTGGTATTGTGATGGACT	579	RT-qPCR
		R TCCAGACAGAGTATTTGCGCT		
<i>elongation factor 1α</i>	AB056104	F CCCTGGCCACAGAGATTTC	101	RT-qPCR
		R CAGCCTCGAACTACCAACA		
<i>18s</i>	FJ710820.1	F GGATGCCCTTAAGTGGGTGT	206	RT-qPCR
		R CTAGCGGCGCAATACGAATG		

F: forward, R: reverse

doi:10.1371/journal.pone.0141043.t001

telencephalon and diencephalon without hypothalamus), hypothalamus, hindbrain (including mesencephalon and rhombencephalon), pituitary and gastrointestinal tract (including esophagus, intestinal bulb, j-loop and anterior intestine) were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. Sampling during darkness was conducted under dim red lighting.

### Molecular cloning of *preproghrelin* and *ghs-r1a* genes of goldfish and riboprobe synthesis

For the molecular cloning of *preproghrelin* and *ghs-r1a* genes, specific primers (Table 1) were designed based on the goldfish sequences (GenBank accession numbers AF454389.1 for *preproghrelin*, AB504275.1 for *ghs-r1a1*, and AB504276.1 for *ghs-r1a2*) and were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). To clone *preproghrelin* gene (366 bp), the reaction mixture contained cDNA from goldfish gastrointestinal tract, GoTaq® Green MasterMix (Promega, Madison, WI, USA), and forward and reverse primers (3 nM each). To clone *ghs-r1a* gene (979 bp), the reaction mixture contained cDNA from goldfish gastrointestinal tract, Taq DNA Polymerase with its buffer (0.00125 U; Invitrogen), dNTPs (10 mM each), MgCl<sub>2</sub> (6 mM), and forward and reverse primers (3 nM each). These primers were able to distinguish between the *ghs-r1a* and *ghs-r1b* splicing variants, but unable to distinctly identify *ghs-r1a1* and *ghs-r1a2* subtypes. PCRs were performed in a total volume of 25 µl. PCR conditions were set at 95°C for 3 min followed by 40 cycles of 95°C for 10 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 1 min, and a final extension step of 72°C for 10 min. The amplified products were run on an agarose gel and purified using PCR clean-up gel extraction (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co., Düren, Germany) for *preproghrelin* gene and GenElute gel extraction kit (Sigma, Steinheim, Germany) for *ghs-r1a* gene. Purified *preproghrelin* and *ghs-r1a* PCR products were ligated into pCR®II- TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or pCR™4-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vectors, respectively, and employed to transform *Escherichia coli* One Shot TOP10 cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or JM109 cells (Promega, Madison, WI, USA), respectively. Positive clones were collected and plasmid DNA extraction was performed by using a routine miniprep protocol. Plasmids with the insert were linearized with *SpeI* and *NotI*.

Antisense and sense mRNA probes were obtained with DIG RNA labeling MIX (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) by *in vitro* transcription with T7 and SP6 RNA polymerases (Promega, Madison, WI, USA) for *preproghrelin* gene, and with T7 and T3 RNA polymerases (Promega, Madison, WI, USA) for *ghs-r1a* gene probes. The specificity of the probes was confirmed with parallel series of slides hybridized with the correspondent sense RNA probes.

### Localization of *preproghrelin* and *ghs-r1a* by *in situ* hybridization (ISH)

The presence and anatomical distribution of *preproghrelin* and *ghs-r1a* transcripts in the brain and gastrointestinal tract of goldfish were studied by *in situ* hybridization. For this purpose, samples obtained as described earlier were embedded in TissueTek and sectioned at 8- $\mu$ m thickness using a cryostat. Transverse sections were mounted onto superfrost slides (Thermo scientific, Braunschweig, Germany). The protocol for ISH was performed as previously described [38] with minor modifications. In brief, cryostat sections were washed in PBS two times during 10 min before post-fixation in *Antigenfix* (DiaPath, Martinengo, Italy) for 20 min. After washing in PBS, sections were treated for 5 min at 37°C with proteinase K (2  $\mu$ g/ml, Sigma, Steinheim, Germany) diluted in PBS, and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min. Sections were rinsed twice in 2X standard saline citrate (SSC). Hybridization was performed at 65°C overnight in a humidified chamber using 100  $\mu$ l hybridization buffer (50% deionized formamide; 2x SSC; 5x Denhardt's solution; 50  $\mu$ g/ml of yeast tRNA; 4 mM EDTA; 2.5% dextran sulfate) containing the DIG-labeled probe (3  $\mu$ g/ml). After hybridization, slides were washed in 2x SSC at 65°C (2x30 min), 2x SSC/50% formamide at 65°C (2x30 min), 0.2x SSC (1x15 min) and 0.1x SSC (1x15 min) at room temperature. Slides were next washed in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 150 mM NaCl for 10 min, then washed in the same buffer containing 0.1% Triton and 0.5% of skimmed milk powder (2x30 min), and incubated overnight at room temperature with anti-digoxigenin alkaline phosphatase Fab fragments (1:2,000; Roche Pharma, Mannheim, Germany). The next day, slides were incubated for 4.5 h with an HNPP (2-hydroxy-3-naphthoic acid -2'-phenylanilide phosphate)/FastRED detection kit (Roche Pharma, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. Finally, Vectashield mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was applied and coverslips were placed. Slides were observed with an epifluorescence microscope (Olympus Provis, equipped with a DP71 digital camera). Images were processed with either the Olympus Analysis or Zeiss Cell software. Micrographs were generated in the "TIFF" format and adjusted linearly for light and contrast before being assembled on plates using Photoshop CS6.

### Localization of ghrelin by immunohistochemistry (IHC)

Immunohistochemical staining of goldfish brain and gastrointestinal tract samples was used to study the anatomical distribution of ghrelin. The immunohistochemistry study was carried out as previously described [39]. Briefly, the above described cryostat sections were washed twice in 0.1M PBS and incubated twice in PBS containing 0.2% Triton and 0.5% of skimmed milk powder (45 min at room temperature). After overnight incubation with primary monoclonal antibody (mouse anti human ghrelin 1:200; ab57222, Abcam, Cambridge, MA, USA), previously used in goldfish by Kerbel and Unniappan [13], sections were washed three times in 0.2% Triton PBS and subsequently incubated with rabbit antimouse Alexa Fluor 488 (1:400; Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 2 hours at room temperature. A separate set of negative control slides were only treated with the secondary antibody (S1 Fig). After washing in PBS, slides were coverslipped with Vectashield containing DAPI and observed with

an epifluorescence microscope (Olympus Provis, equipped with a DP71 digital camera). Imaging processing was conducted as described previously for ISH.

### Analysis of daily *preproghrelin* and *ghs-r1* mRNA expression by RT-qPCR

The possible 24-h rhythmic expression of *preproghrelin* and *ghs-r1* in the brain and gastrointestinal tract of goldfish was studied using Real-time or Reverse Transcription-quantitative PCRs (RT-qPCR). Total RNA from forebrain, hypothalamus, hindbrain, pituitary and gastrointestinal tract was isolated using TRIzol RNA isolation reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA purity was validated by optical density absorption ratio (260/280 nm) using a NanoDrop 2000c (Thermo, Vantaa, Finland). Then, an aliquot of 1 µg of total RNA was reverse transcribed into cDNA in a 20 µl reaction volume using iScript cDNA synthesis kit (BioRad, Hercules, USA) according to the manufacturer's instructions. The RT reactions condition consisted in 25°C for 5 min, an extension of 30 min at 42°C and a denaturalization step at 85°C for 5 min, and were carried out in a T100 Thermal Cycler (BioRad, Hercules, USA).

RT-qPCRs were performed using iQ SYBR Green Supermix (BioRad, Hercules, USA). The specific primer sequences used for target genes *preproghrelin* and *ghs-r1*, and reference genes *β-actin* (accession number AB039726.2), *elongation factor 1α* (EF1α; accession number AB056104) and *18s* (accession number FJ710820.1) were ordered to IDT (Ontario, Canada) and are shown in [Table 1](#). Primers used for quantifying ghrelin receptor were designed on the exon 1 (common for *ghs-r1a* and *ghs-r1b* splicing variants) and in a region conserved between the *ghs-r1a1* and *ghs-r1a2* sequences, so PCR products correspond to the sum of all *ghs-r1* mRNA isoforms mentioned. Genes were amplified in duplicated qPCR runs using a 96-well plate loaded with 1 µL of cDNA and 500 nM of each forward and reverse primer in a final volume of 20 µL. Each PCR run included a standard curve for the corresponding gene made of two replicates of three serial dilution points and water controls to ensure that the reagents were not contaminated. RT-qPCR cycling conditions consisted of a ramp of 95°C for 5 min, 35 cycles of 95°C for 30 sec, 56.6°C/60°C (*preproghrelin* and *ghs-r1*, respectively) for 30 sec and 73°C for 30 sec, and a final step of 95°C for 10 min. A melting curve was systematically monitored (temperature gradient at 0.5°C/5 sec from 65 to 95°C) at the end of each run to confirm the specificity of the amplification reaction. In addition, PCR products were electrophoresed on a 1% agarose gel, and single bands for each gene were purified using GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and sequenced (Secugen, Madrid, Spain). The efficiency of the amplification for all studied genes was around 100%. All runs were performed using a CFX Connect Real-time System (BioRad, Hercules, USA). The 2-ΔΔCt method [40] was used to determine the relative mRNA expression, assigning the relative value of '1' to the sampling time with the lowest expression values.

### Statistics

Analysis of mRNA relative abundance among time points was conducted using one-way ANOVA followed by post-hoc Student-Newman-Keuls multiple comparison test. All analyses were carried out using SigmaStat 12.0 statistics package. In addition, to evaluate rhythmicity of gene expression, cosinor analysis was performed by fitting periodic sinusoidal functions to the expression values for the genes across the seven time points. The formula used was  $f(t) = M + A \cos(\pi/12 - \Pi)$ , where  $f(t)$  is the gene expression level in a given time, the mesor ( $M$ ) is the mean value,  $A$  is the sinusoidal amplitude of oscillation,  $t$  is time in hours and  $\Pi$  is the acrophase (time of peak expression). Non-linear regression allows the estimation of  $M$ ,  $A$ , and  $\Pi$ , and their standard error (SE) [41]. Significance of cosinor analysis was tested using the

zero-amplitude test, which indicates if the sinusoidal amplitude differs from 0 with a given probability [42]. The time series data were considered to display a significant 24-h rhythm when  $p < 0.05$  by ANOVA, and  $p < 0.005$  by the zero-amplitude test with cosinor analysis.

## Results

### Brain and gastrointestinal distribution of *preproghrelin*, ghrelin and *ghs-r1a* in goldfish

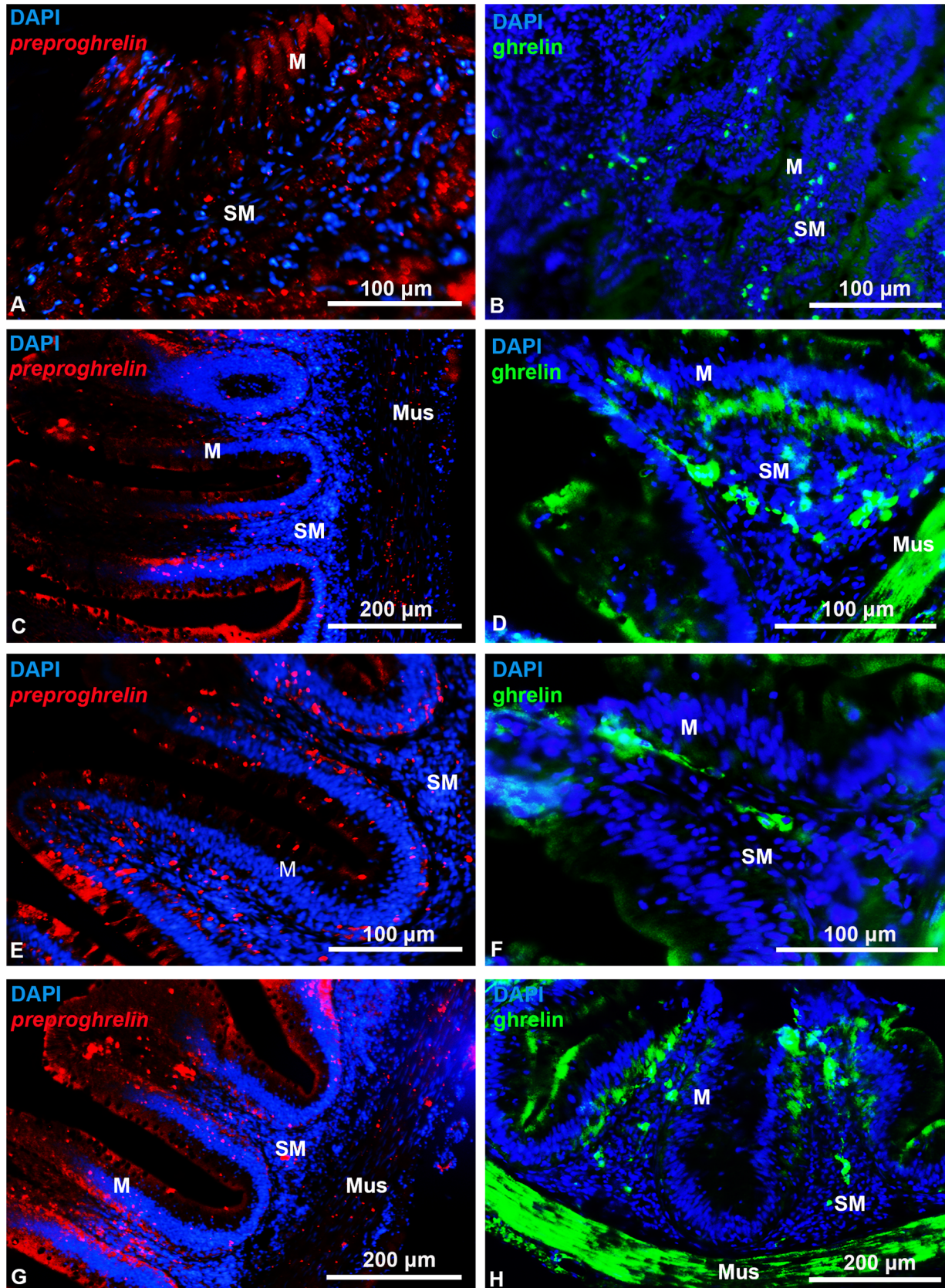
The *preproghrelin* and *ghs-r1a* mRNAs were observed surrounding the nucleus of the cells (A, B, D, E in [S1 Fig](#)), while the sense riboprobes yielded no signal (C, F in [S1 Fig](#)), supporting the specificity of the obtained signal under the conditions employed. Only some blood cells show unspecific labeling in both sense and antisense riboprobes (C, F in [S1 Fig](#)). For the immunohistochemical analysis, specific signal of the peptide is observed at the cytoplasm level in the gastrointestinal tract cells (G in [S1 Fig](#)) and no staining was observed in the control sections stained only with the secondary antibody (H in [S1 Fig](#)).

*Preproghrelin* mRNA expression and ghrelin were found by ISH and IHC in the mucosal and submucosal layers of all the sections analyzed from the esophagus to the anterior intestine ([Fig 1](#)). *Preproghrelin* transcripts were widely expressed along the esophagus ([Fig 1A](#)), while in the intestinal bulb, j-loop and anterior intestine, signal of *preproghrelin* probes was mainly located in the most basal cells of the mucosal epithelium and in the submucosal layer, with lower expression in the muscular layer ([Fig 1C, 1E and 1G](#)). Ghrelin-like immunoreactivity (ir) was higher in cells of the submucosal layer in the esophagus, intestinal bulb and j-loop, while in the anterior intestine, it was predominant in cells of the mucosal layer although still detected in the submucosa ([Fig 1B, 1D, 1F and 1H](#)). Ghrelin-like ir was also observed in the muscular layer of the gastrointestinal tract ([Fig 1D and 1H](#)). *Preproghrelin* mRNA expression and ghrelin were undetected in goldfish brain neither by ISH nor by IHC.

The goldfish brain showed widespread distribution of *ghs-r1a* mRNA ([Figs 2–5](#)). Expression of *ghs-r1a* gene within the telencephalon was found in almost all the different areas in the pallial and subpallial regions ([Figs 2A, 2B, 2C and 3](#)). In the hypothalamus, *ghs-r1a* expressing cells were detected in the nucleus of the posterior recess ([Figs 2D and 4D](#)), the preoptic region, specifically in the periventricular preoptic nucleus ([Figs 2B and 4A](#)), and in the nucleus of the lateral recess ([Figs 2D, 4E and 4G](#)), with the highest levels of signal observed in the anterior periventricular nucleus (homologous to the mammalian suprachiasmatic nucleus) and in the magnocellular area of the preoptic nucleus ([Figs 2B, 2C, 4B and 4C](#)). The *ghs-r1a* expression showed a specific pattern in the nucleus of the lateral recess: it was found only in the lateral area of the most anterior part ([Figs 2D and 4E](#)), but it extends to the medial area ([Figs 2E and 4F](#)) until *ghs-r1a* mRNA surrounds completely this nucleus in posterior sections ([Figs 2F and 4G](#)). There were *ghs-r1a* expressing cells in the pineal gland and in the habenular nuclei ([Figs 2D, 5A and 5B](#)). *Ghs-r1a* transcripts were also detected in the *torus longitudinalis* ([Figs 2F and 5C](#)) and the highest expression was observed in the valvula of the cerebellum of the metencephalon ([Figs 2F and 5D](#)).

The *ghs-r1a* expression along the gastrointestinal tract of goldfish is shown in [Fig 6](#). A wide distribution was observed in esophagus ([Fig 6A](#)), whereas in the intestinal bulb ([Fig 6B](#)), j-loop ([Fig 6C](#)) and anterior intestine ([Fig 6D](#)), *ghs-r1a* expression was observed only in most apical cells of the mucosal epithelium and in the submucosal layer.





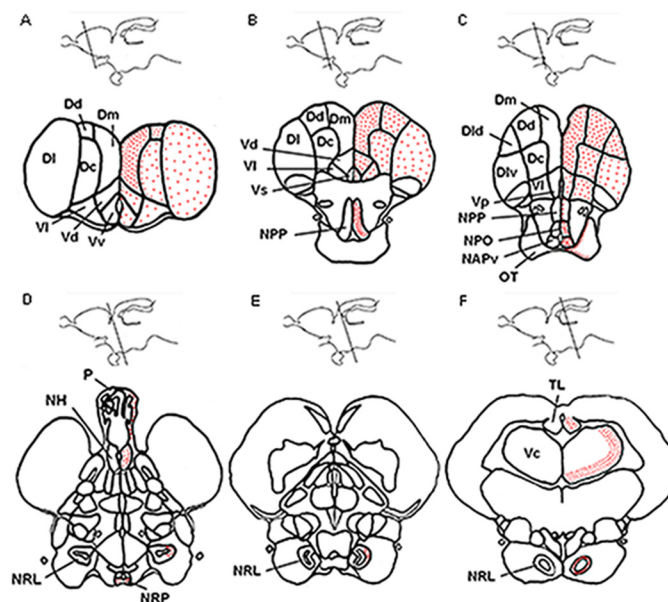
**Fig 1. Transversal representative sections of goldfish gastrointestinal tract showing *preproghrelin* positive cells identified by *in situ* hybridization (left panel) and ghrelin immunoreactive cells detected by immunohistochemistry (right panel). (A, B) Esophagus. (C, D) Intestinal bulb. (E, F) j-loop. (G, H) Anterior intestine. M, mucose; Mus, muscular layer; SM, submucose. Scale bars are indicated in each image.**

doi:10.1371/journal.pone.0141043.g001

## Daily expression of *preproghrelin* and *ghs-r1* ghrelin receptor in goldfish

The daily pattern of *preproghrelin* expression in goldfish forebrain, hypothalamus, hindbrain, pituitary and gastrointestinal tract during a 12L:12D photocycle is shown in Fig 7. Statistical analysis (ANOVA and cosinor) showed that *preproghrelin* transcripts displayed significant rhythmic oscillations as a function of the 24-h cycle in hypothalamus (Fig 7B), pituitary (Fig 7D) and gastrointestinal tract (Fig 7E), with acrophases at nighttime. The acrophases in hypothalamus and gastrointestinal tract were advanced around 3–4 h as compared to pituitary (Table 2). The amplitude of *preproghrelin* daily rhythm was 3-fold higher in gastrointestinal tract compared to the hypothalamus and pituitary. No significant differences throughout the 24-h cycle were detected in *preproghrelin* expression in the forebrain and hindbrain.

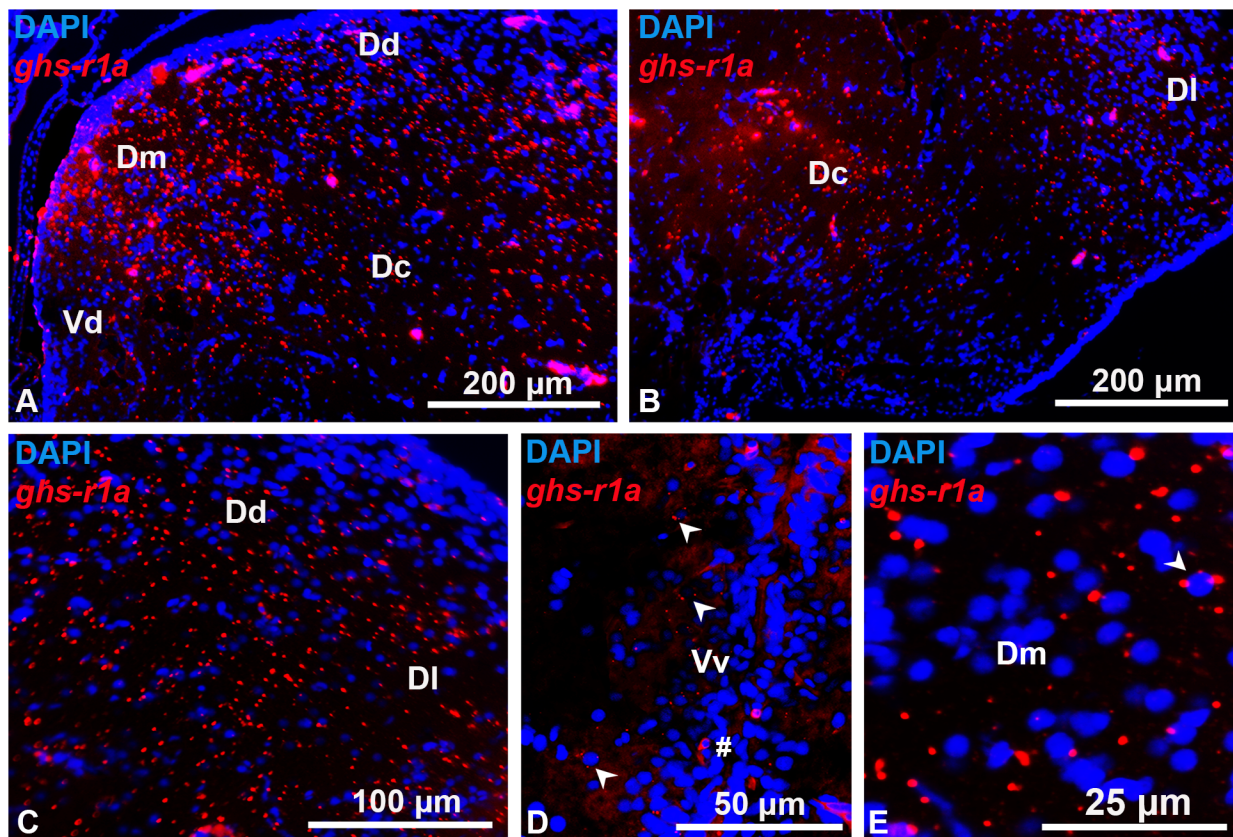
The quantitative analysis of *ghs-r1* daily expression demonstrates the existence of a 24-h rhythmic profile in the hypothalamus and pituitary, with higher abundance of transcripts during the dark phase of the daily photocycle (Fig 8). In both tissues, the acrophase and amplitude of *ghs-r1* daily rhythms were similar to those found for *preproghrelin* (Table 2). Expression of



**Fig 2. Schematic representation of *ghs-r1a* expressing cells in antero-posterior (A to F) transversal sections of goldfish brain [Carassius auratus Forebrain Atlas [43]].** The brain areas shown in the transversal sections are indicated with a schematic representation in the upper part of each image. Intensity of signal is represented by density of red dots. Dc, central portion of the dorsal telencephalon; Dd, dorsal portion of the dorsal telencephalon; Dl, lateral portion of the dorsal telencephalon; Dld, dorsal part of the lateral portion of the dorsal telencephalon; Dlv, ventral part of the lateral portion of the dorsal telencephalon; Dm, medial portion of the dorsal telencephalon; NAPv, anterior periventricular nucleus; NH, habenular nucleus; NPO, preoptic nucleus; NPP, periventricular preoptic nucleus; NRL, lateral recess nucleus; NRP, posterior recess nucleus; OT, optic tract; P, pineal; TL, torus longitudinalis; Vc, valvula of the cerebellum; Vd, dorsal portion of the ventral telencephalon; Vl, lateral portion of the ventral telencephalon; Vp, postcommissural portion of the ventral telencephalon; Vs, supracommissural portion of the ventral telencephalon; Vv, ventral portion of the ventral telencephalon.

doi:10.1371/journal.pone.0141043.g002





**Fig 3. Transversal representative sections of goldfish telencephalon showing *ghs-r1a* positive cells detected by *in situ* hybridization.** (A, B) Overview of telencephalon. (C) Lateral portion of the dorsal telencephalon. (D) Ventral portion of the ventral telencephalon (arrowheads indicate riboprobe signaling). (E) Example of telencephalic nucleus surrounded by *ghs-r1a* mRNA riboprobe (arrowhead). Dc, central portion of the dorsal telencephalon; Dd, dorsal portion of the dorsal telencephalon; DI, lateral portion of the dorsal telencephalon; Dm, medial portion of the dorsal telencephalon; Vd, dorsal portion of the ventral telencephalon; Vv, ventral portion of the ventral telencephalon. Scale bars are indicated in each image.

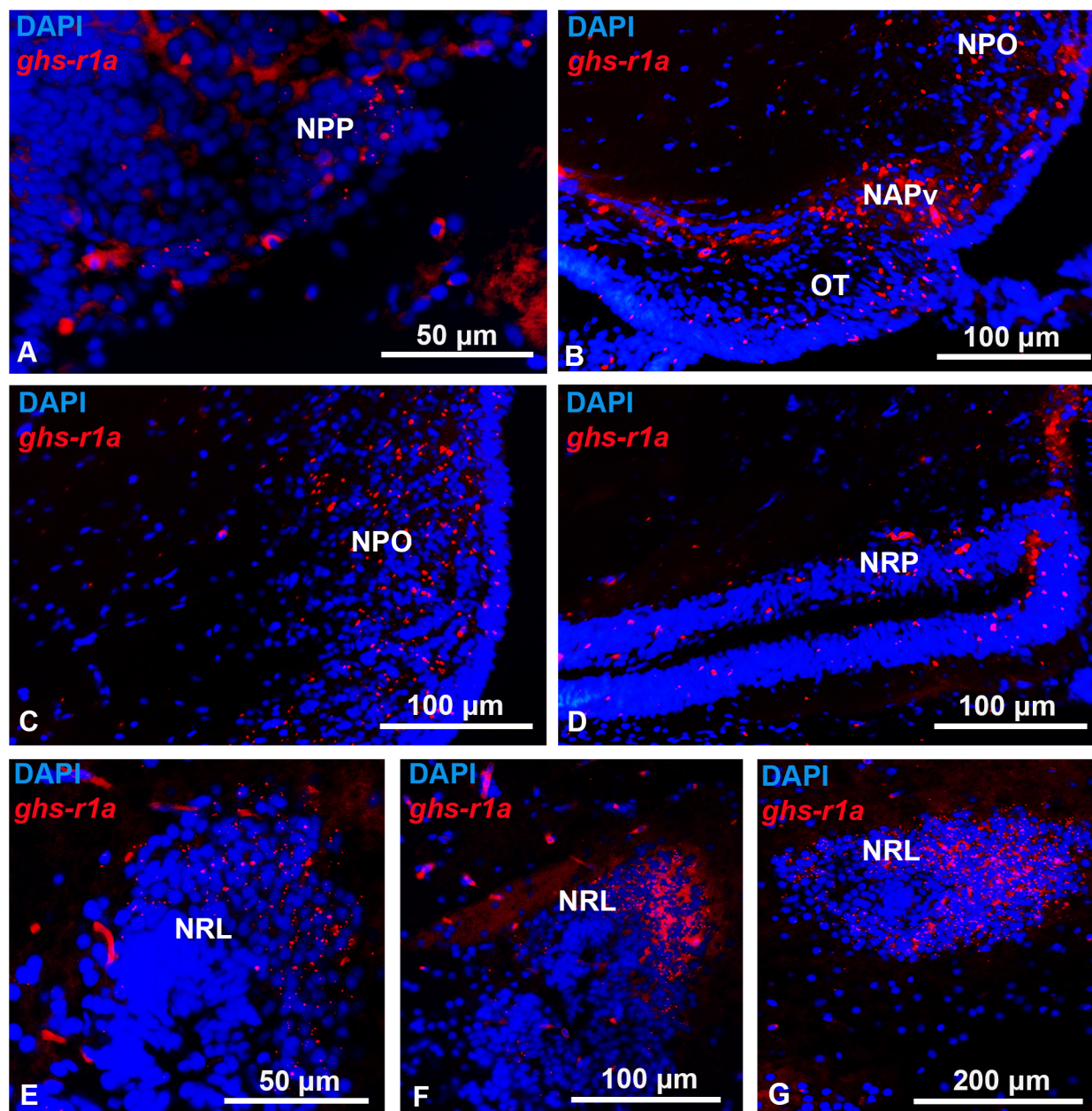
doi:10.1371/journal.pone.0141043.g003

*ghs-r1* was not significantly modified throughout the 24-h cycle in goldfish forebrain, hind-brain and gastrointestinal tract.

## Discussion

The ghrelinergic system is a key regulator of numerous physiological processes, particularly metabolism and reproduction in fish. The brain and gastrointestinal tract are sources of ghrelin, and are major contributors to the endocrine regulation of both, metabolism and reproduction. However, two critically missing information on ghrelin biology are cellular localization of ghrelin transcripts and ghrelin, and the circadian profile of ghrelin in fish tissues. The novel results of this research address both of these paucities in fish ghrelin literature. This study shows for the first time the detailed neuroanatomical distribution of ghrelin and *ghs-r1* in a non-mammal, and the existence of a daily rhythmic expression of *preproghrelin* and *ghs-r1* in the hypothalamus, pituitary, and gastrointestinal tract of goldfish.

Several studies using RT-PCR reported a wide expression of *preproghrelin* mRNA in the brain of fish [5–7] and mammals [3], but its anatomical distribution in discrete encephalic areas remains to be described. Present data support such a broad expression of *preproghrelin* in the goldfish brain by RT-qPCR analyses, but it was undetectable by *in situ* hybridization and immunohistochemical analysis. A possible explanation for these discrepancies might lie on the

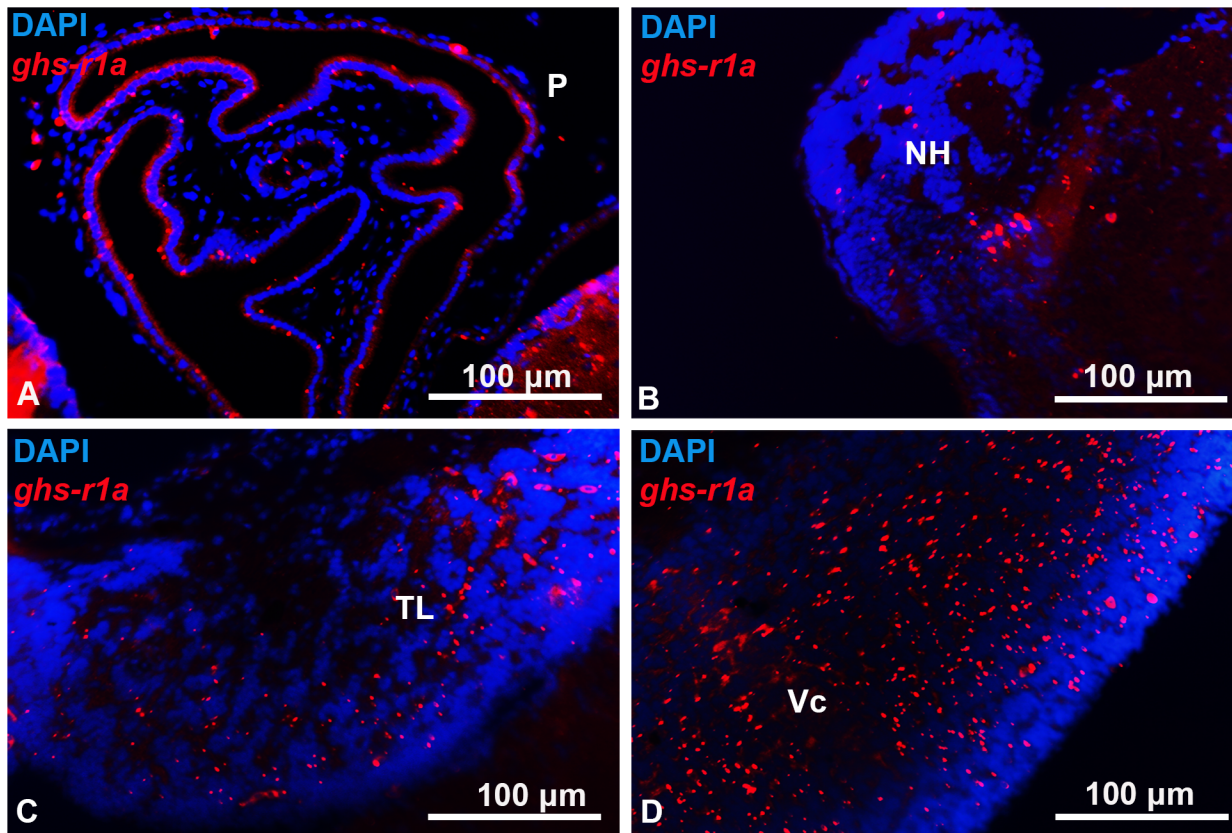


**Fig 4. Transversal representative sections of goldfish hypothalamus showing *ghs-r1a* positive cells detected by *in situ* hybridization.** (A) Periventricular preoptic nucleus. (B) Preoptic recess. (C) Preoptic nucleus. (D) Posterior recess nucleus. E, F, G. Lateral recess nucleus. NAPv, anterior periventricular nucleus; NPO, preoptic nucleus; NPP, periventricular preoptic nucleus; NRL, lateral recess nucleus; NRP, posterior recess nucleus; OT, optic tract. Scale bars are indicated in each image.

doi:10.1371/journal.pone.0141043.g004

different age and body weight of fish used for both studies. Thus, it is possible that ghrelin transcript levels in small and immature fish are considerably lower than in big and mature fish, and so be undetected by less sensitive techniques such as ISH and IHC. Furthermore, this is in contrast to a recent study using imaging techniques in which *preproghrelin* was detected in goldfish hypothalamus [13] by IHC. Again, the reproductive stage and metabolic status of fish used in both experiments were significantly different (1.5–2.5 g vs 10–20 g) and so might be influencing in the different results observed in one study and the other. This may indicate that



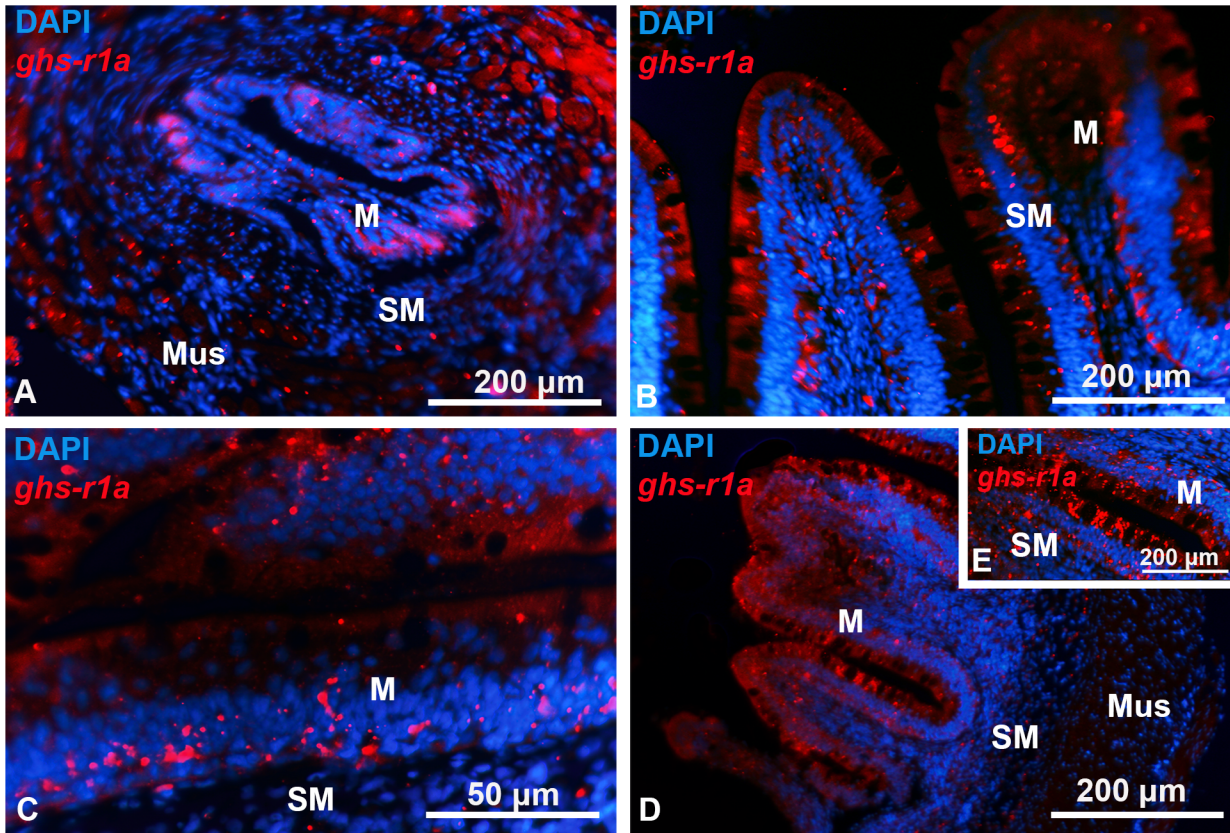


**Fig 5.** Transversal representative sections of goldfish pineal (A), habenula (B), torus longitudinalis (C) and valvula of the cerebellum (D) showing *ghs-r1a* positive cells detected by *in situ* hybridization. NH habenular nucleus; P, pineal; TL, torus longitudinalis; Vc, valvula cerebelli. Scale bars are indicated in each image.

doi:10.1371/journal.pone.0141043.g005

detecting ghrelin transcripts in goldfish brain using imaging techniques requires delicate refinement of the techniques used, including higher concentrations of probes/antibodies, longer incubation times, etc.

In the gastrointestinal tract, *preproghrelin* mRNA expression and ghrelin are found by *in situ* hybridization and immunohistochemistry, respectively, with a similar intense signal in all the studied sections. The strong signal detected for *preproghrelin* mRNA expression and ghrelin-like immunoreactivity in proximal sections of the gastrointestinal tract is in accordance with previous studies on the enteric location of this hormone in other vertebrates, where ghrelin was predominantly detected in the anterior part of the gastrointestinal tract. In this respect, ghrelin immunoreactivity decreased from the small to the large intestine was observed in rodents [9], and several studies have reported the stomach as the portion of the intestine with more ghrelin-immunoreactive cells in mammals [1,9,11,12]. Also, in chickens, ghrelin immunoreactive cells were found in the proventriculus and in the small intestine [44]. Finally, in fish, ghrelin immunostaining was predominantly found in the stomach of rainbow trout [16] and sea bass [14], and in the proximal intestine of goldfish [14]. Then, the location of this peptide in the gastrointestinal tract is highly conserved through phylogeny. Furthermore, results from our study show that ghrelin-like immunoreactivity within the gastrointestinal sections is most abundant in the mucosa, which is consistent with previous observations in both mammals [9–12] and fish [14–16]. This observation, together with the fact that *preproghrelin*

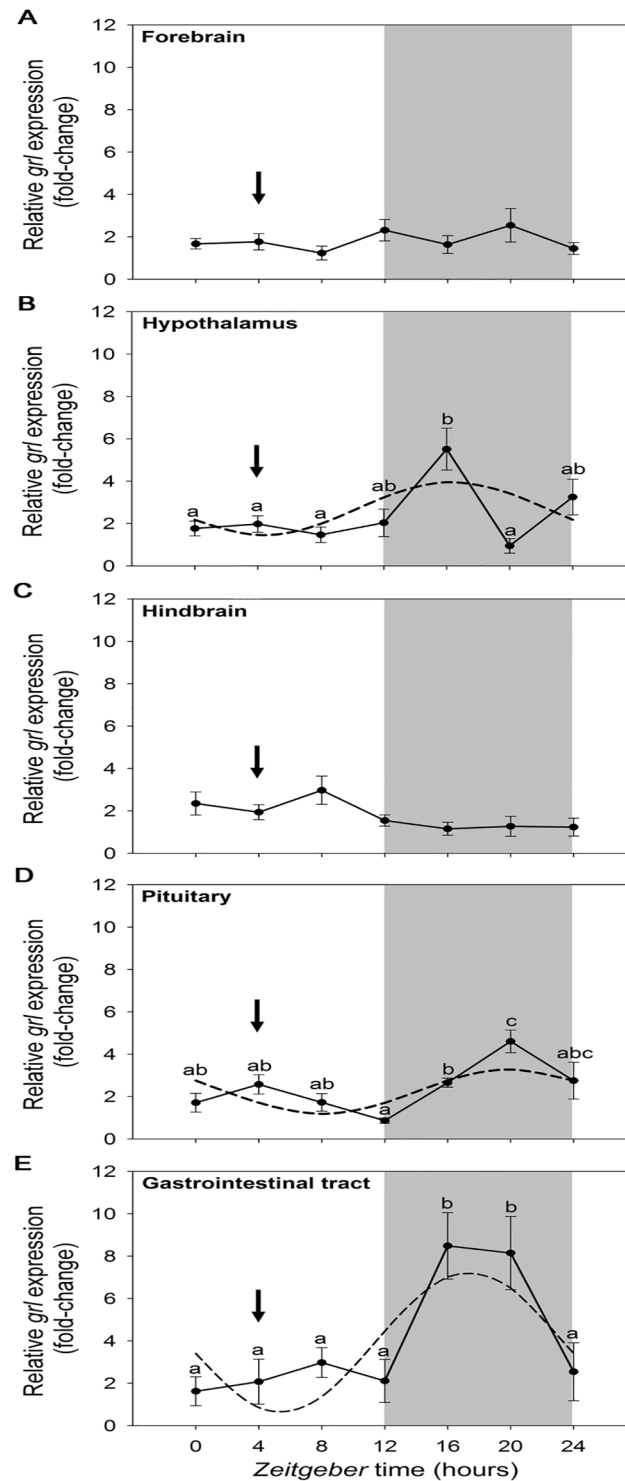


**Fig 6. Transversal representative sections of goldfish gastrointestinal tract showing *ghs-r1a* positive cells detected by *in situ* hybridization.** (A) Esophagus. (B) Intestinal bulb. (C) j-loop. (D, E) Anterior intestine. M, mucose; Mus, muscular layer; SM, submucose. Scale bars are indicated in each image.

doi:10.1371/journal.pone.0141043.g006

mRNA was found in the same locations than the peptide, support the mucosal cells as the primary synthesizing site of ghrelin in goldfish.

A second integral component in the ghrelinergic system is its receptor. Our results show that *ghs-r1a* gene is widely expressed in the goldfish brain, from telencephalon to the cerebellum. This is consistent with a previous study describing the expression of the same gene in goldfish brain areas by RT-q PCR, in which expression of *ghs-r1a1* and *ghs-r1a2* was predominantly observed in telencephalon, diencephalon and vagal lobe [23]. In addition, rich expression of *ghs-r1a* is detected in the present study in specific hypothalamic nucleus, such as the lateral recess nucleus, in agreement with the well known orexigenic role of the ghrelinergic system. An interesting observation derived from the present study is that encephalic areas where *ghs-r1a* expression is predominant are known to contain cells that also express other appetite-regulating hormones. For instance, all hypothalamic nuclei expressing *ghs-r1a*, and even some extrahypothalamic locations where *ghs-r1* was found, including the valvula cerebelli, the habenula, the pineal gland and the torus longitudinalis, all have been previously related with the orexinergic system in zebrafish [45,46]. Similarly, we report here an important expression of *ghs-r1a* in the periventricular preoptic nucleus, the anterior part of the periventricular nucleus, the preoptic nucleus and the nucleus of the lateral recess, areas that take part of the NPY system in the European seabass [47] and goldfish [48]. Indeed, a colocalization of the ghrelin receptor and NPY in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat, a key nucleus involved in food intake regulation, has been previously reported [28]. This co-expression of both ghrelin receptor and



**Fig 7. Relative expression of *preproghrelin* in goldfish forebrain (A), hypothalamus (B), hindbrain (C), pituitary (D) and gastrointestinal tract (E) during a 24-h light/dark cycle.** Relative mRNA amounts were quantified by RT-qPCR. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ /time point). The grey area indicates the dark phase of the daily photocycle, and the arrow indicates the scheduled feeding time (ZT-4). Dashed lines represent the periodic sinusoidal functions determined by the cosinor analysis when a significant rhythm was detected. Different letters indicate significant differences by ANOVA and post-hoc SNK test ( $p < 0.05$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0141043.g007



**Table 2. Parameters defining the expression rhythms of *preproghrelin* and *ghs-r1* in goldfish.**

	Mesor	Amplitude	Acrophase
<b><i>Preproghrelin</i></b>			
<i>Hypothalamus</i>	2.7 ± 0.3	1.2 ± 0.4 <i>[0.1, 2.3]</i>	16.3 ± 1.3
<i>Pituitary</i>	2.2 ± 0.2	1.0 ± 0.3 <i>[0.2, 1.8]</i>	20.0 ± 1.2
<i>Gastrointestinal tract</i>	3.9 ± 0.5	3.3 ± 0.8 <i>[1.1, 5.5]</i>	17.4 ± 0.8
<b><i>ghs-r1</i></b>			
<i>Hypothalamus</i>	1.5 ± 0.2	0.9 ± 0.2 <i>[0.4, 1.4]</i>	16.9 ± 0.9
<i>Pituitary</i>	2.7 ± 0.3	1.4 ± 0.5 <i>[0.1, 2.7]</i>	19.4 ± 1.2

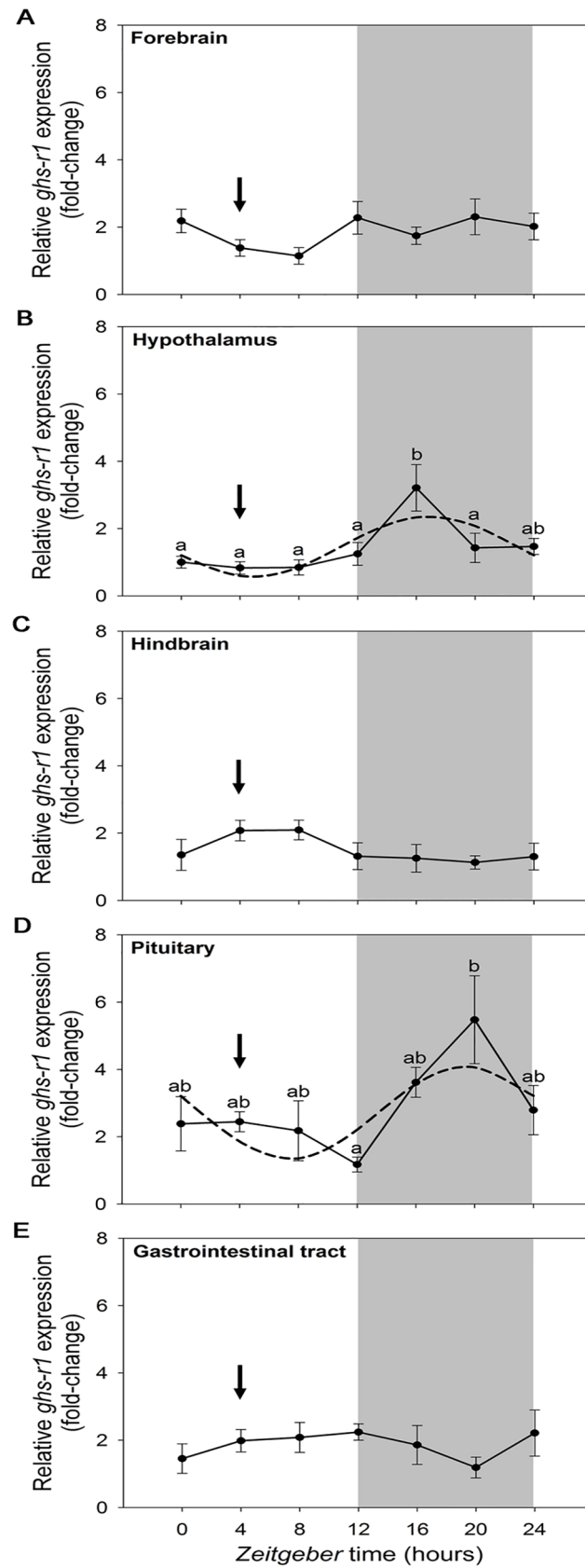
The confidence intervals (99%) of the amplitude values are shown in italics inside the square brackets

doi:10.1371/journal.pone.0141043.t002

appetite-regulating neuropeptides in feeding-related specific brain areas, as well as the reported physiological interactions among the ghrelinergic system and other orexigenic agents [49–51], support the cross-talking between ghrelin and other orexigenic agents in the feeding regulation.

In the gastrointestinal tract, *ghs-r1a* gene was found mainly in the mucosal epithelium of all the areas studied, matching the expression of *preproghrelin* gene. However, interestingly, the expression of the receptor was highest in the most apical cells of mucosal folds, while highest levels of the prepropeptide were observed in the most basal cells of this epithelium. Ghrelin receptor immunoreactivity in the gastrointestinal tract has only been reported in zebrafish by Olsson and co-workers [15], who described the presence of the receptor in numerous endocrine cells of the mucosa and in the muscle layers along the entire intestine. This important presence of ghrelin receptors in the muscle layers of the zebrafish gut was suggested to be related with motility functions of ghrelin in this teleost [15]. In the present study, *ghs-r1a* expressing cells in the muscle layer were only observed in the esophagus, but not in the intestinal bulb, j-loop and anterior intestine. In fact, it is to note that ghrelin was ineffective on gut motility in rainbow trout and goldfish [52], which is consistent with present results on the absence of ghrelin receptors in the muscle layers of goldfish gastrointestinal tract, but in contrast with results on zebrafish [15]. Together, here we show the brain-gut mapping of ghrelin and its receptor, two main components of the ghrelinergic system, in goldfish. GOAT, the third peptide in this hormonal system, is yet to be identified in goldfish and future studies warrant its localization.

Previous research [53] shows ghrelin is a multifunctional peptide in fish, and our current results show extensive, yet cell specific localization of ghrelin and its receptor in goldfish tissues. Is there a daily pattern of expression for ghrelin and GHS-R in goldfish? In fact, recent studies in this teleost show that some food intake regulatory hormones, such as NPY [29] and leptin [30], display daily oscillations in response to the 24-h light/dark cycle, suggesting a relationship between the orexigenic system and circadian organization. Such a relationship between ghrelin and the circadian system has been pointed out in mammals, where the stomach ghrelin-secreting cells were described to contain the machinery that constitutes a food entrainable oscillator [54]. However, no studies to date have analyzed daily changes in expression of *preproghrelin* and its receptors in any vertebrate group. Our results demonstrate daily



**Fig 8. Relative expression of *ghs-r1* in goldfish forebrain (A), hypothalamus (B), hindbrain (C), pituitary (D) and gastrointestinal tract (E) during a 24-h light/dark cycle.** Relative mRNA amounts were quantified by RT-qPCR. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 6/time point). The grey area indicates the dark phase of the daily photocycle, and the arrow indicates the scheduled feeding time (ZT-4). Dashed lines represent the periodic sinusoidal functions determined by the cosinor analysis when a significant rhythm was detected. Different letters indicate significant differences by ANOVA and post-hoc SNK test ( $p < 0.05$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0141043.g008

rhythms of *preproghrelin* and *ghs-r1* expression in hypothalamus and pituitary of goldfish maintained under scheduled photoperiod and feeding regime. Considering the key role played by the hypothalamus in the functional organization of the circadian system [55], the existence of daily rhythms in the hypothalamic ghrelinergic system supports such interplay between ghrelin and the circadian system. Moreover, it is important to note that a high expression of *ghs-r1a* was detected in specific hypothalamic nucleus related with the circadian organization, such as the anterior periventricular nucleus, which is homologous to the mammalian suprachiasmatic nucleus, the master clock regulating circadian functions in these vertebrates [56]. In the periphery, the daily expression pattern found for *preproghrelin*, but not for *ghs-r1* in the gastrointestinal tract, might suggest that the daily regulation of ghrelin-related genes in peripheral organs is exerted only on bioactive peptide synthesis, without effect on its receptors. It is also interesting that the amplitude of the *preproghrelin* expression rhythm is nearly 3-fold higher in the gastrointestinal tract compared to hypothalamus and pituitary. This strength in rhythmicity reinforces the proposal that ghrelin might be an important output of the intestinal oscillator.

Present results revealed a major finding regarding the nocturnal acrophase of the *preproghrelin* and *ghs-r1* expression rhythms in both central and peripheral locations. The biological significance of *preproghrelin* and *ghs-r1* transcripts peaking during the night remains to be elucidated, although it could be related with any of the wide variety of physiological functions that ghrelin is known to exert apart from feeding regulation in non-mammalian vertebrates, i.e. growth, reproduction, immunity [53]. Interestingly, two main observations are to note for a possible crosstalking between the ghrelinergic and the circadian systems. On one hand, the 24-h ghrelinergic expression profile overlaps the one described for melatonin, a key component of the circadian system in vertebrates [57]. On the other, the rhythms are also in phase with the daily rhythms of the negative loop clock genes of the clock molecular machinery (*gper1a*, *gper1b*, *gper3* and *gcry3* in the hypothalamus [58,59] and gut [60,61] of goldfish), and are in antiphase with the genes of the positive loop (*clock1a* and *bmal1* in rainbow trout [62] and senegale sole [63]). Additionally, ghrelin was found to induce the expression of some *per* and *cry* genes, but not *bmal1a*, in goldfish central and peripheral tissues [37]. The possible connection between the ghrelinergic system with negative elements of the circadian molecular machinery, such as *per*, is also supported by the similar anatomical distribution reported in present study for *ghs-r1a* gene in brain, and the one previously reported for *gper1b* gene in goldfish maintained under the same environmental conditions [59]. All these parallelisms clearly suggest a connection between the ghrelinergic system and clock genes expression, although further studies are required to demonstrate the specific implication of ghrelin in this function.

In summary, present results demonstrate that *preproghrelin*, ghrelin and ghrelin receptor *ghs-r1a* are widely expressed in the goldfish brain and gastrointestinal tract, and show for the first time a rhythmical pattern of expression in hypothalamus, pituitary and gastrointestinal tract of goldfish. These rhythmic patterns indicate an important connection between the ghrelinergic system and the circadian system of teleosts, and suggest that ghrelin might be acting alternatively as an input/output of the food entrainable oscillator.

## Supporting Information

**S1 Fig. Specificity of *preproghrelin* and *ghs-r1a* mRNA riboprobes and the antibody anti-human ghrelin.** A, B. Anterior intestine showing *preproghrelin* antisense riboprobes signaling (arrowheads) surrounding the nucleus. C. Anterior intestine showing *preproghrelin* sense riboprobes staining. D, E. Telencephalon showing *ghs-r1a* antisense riboprobes signaling (arrowheads) staining. F. Telencephalon showing *ghs-r1a* sense riboprobes staining. G. Antibody anti-human ghrelin cytoplasmic signal (arrowheads) in the anterior intestine. H. Control anterior intestine without the primary antibody, incubated only with the secondary one. #: Blood cells with unspecific staining. (PDF)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ASB AMB SU OK ALA AIV EI MJD. Performed the experiments: ASB AMB SU OK MMG JIB. Analyzed the data: ASB AMB SU OK MMG JIB. Contributed reagents/materials/analysis tools: SU OK MJD. Wrote the paper: ASB AMB SU ALAG AIV EI MJD.

## References

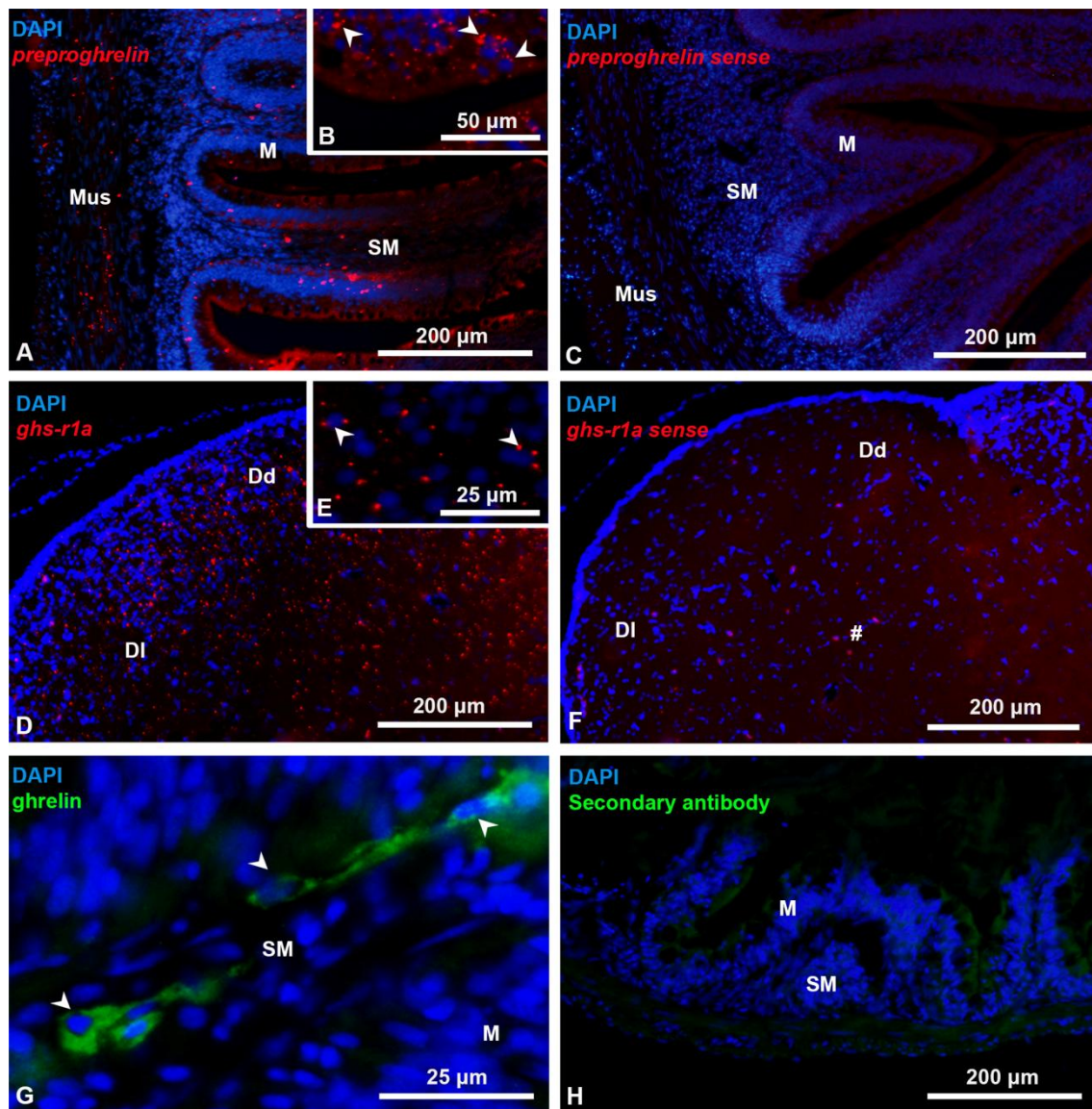
1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999; 402: 656–660. PMID: [10604470](#)
2. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*. 2005; 85: 495–522. PMID: [15788704](#)
3. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 2988–2991. PMID: [12050285](#)
4. Ghelardoni S, Camicelli V, Frascarelli S, Ronca-Testoni S, Zucchi R. Ghrelin tissue distribution: comparison between gene and protein expression. *J Endocrinol Invest*. 2006; 29: 115–121. PMID: [16610236](#)
5. Unniappan S, Lin X, Cervini L, Rivier J, Kaiya H, Kangawa K, et al. Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology*. 2002; 143: 4143–4146. PMID: [12239128](#)
6. Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Moriyama S, Takahashi A, Kawachi H, et al. Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology*. 2003; 144: 5215–5226. PMID: [12970156](#)
7. Feng K, Zhang G-R, Wei K-J, Xiong B-X. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogenetic expression of ghrelin and regulation of expression by fasting and refeeding in the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *J Exp Zool*. 2013; 319: 202–212.
8. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003; 37: 649–661. PMID: [12597862](#)
9. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 2000; 141: 4255–4261. PMID: [11089560](#)
10. Rindi G, Necchi V, Savio A, Torsello A, Zoli M, Locatelli V, et al. Characterisation of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues. *Histochem Cell Biol*. 2002; 117: 511–519. PMID: [12107501](#)
11. Hayashida T, Murakami K, Mogi K, Nishihara M, Nakazato M, Mondal MS, et al. Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Domest Anim Endocrinol*. 2001; 21: 17–24. PMID: [11524171](#)
12. Yabuki A, Ojima T, Kojima M, Nishi Y, Mifune H, Matsumoto M, et al. Characterization and species differences in gastric ghrelin cells from mice, rats and hamsters. *J Anat*. 2004; 205: 239–246. PMID: [15379929](#)

13. Kerbel B, Unniappan S. Nesfatin-1 suppresses energy intake, co-localises ghrelin in the brain and gut, and alters ghrelin, cholecystokinin and orexin mRNA expression in goldfish. *J Neuroendocrinol.* 2012; 24: 366–377. doi: [10.1111/j.1365-2826.2011.02246.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02246.x) PMID: [22023656](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22023656/)
14. Arcamone N, Neglia S, Gargiulo G, Esposito V, Varricchio E, Battaglini P, et al. Distribution of ghrelin peptide in the gastrointestinal tract of stomachless and stomach-containing teleosts. *Microsc Res Tech.* 2009; 72: 525–533. doi: [10.1002/jemt.20709](https://doi.org/10.1002/jemt.20709) PMID: [19322896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19322896/)
15. Olsson C, Holbrook JD, Bompadre G, Jönsson E, Hoyle CHV, Sanger GJ, et al. Identification of genes for the ghrelin and motilin receptors and a novel related gene in fish, and stimulation of intestinal motility in zebrafish (*Danio rerio*) by ghrelin and motilin. *Gen Comp Endocrinol.* 2008; 155: 217–226. PMID: [17582410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17582410/)
16. Sakata I, Mori T, Kaiya H, Yamazaki M, Kangawa K, Inoue K, et al. Localization of ghrelin-producing cells in the stomach of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Zool. Sci.* 2004; 21: 757–762. PMID: [15277719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15277719/)
17. Abizaid A, Horvath TL. Ghrelin and the central regulation of feeding and energy balance. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012; 16: S617–626. doi: [10.4103/2230-8210.105580](https://doi.org/10.4103/2230-8210.105580) PMID: [23565498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23565498/)
18. Depoortere I. Targeting the ghrelin receptor to regulate food intake. *Regul Pept.* 2009; 156: 13–23. doi: [10.1016/j.regpep.2009.04.002](https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.04.002) PMID: [19362579](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19362579/)
19. Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M. Structure, regulation and function of ghrelin. *J Biochem.* 2012; 151: 119–128. doi: [10.1093/jb/mvr134](https://doi.org/10.1093/jb/mvr134) PMID: [22041973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22041973/)
20. Delporte C. Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica.* 2013; 2013: 1–25.
21. Gutiérrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 6320–6325. doi: [10.1073/pnas.0800708105](https://doi.org/10.1073/pnas.0800708105) PMID: [18443287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18443287/)
22. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell.* 2008; 132: 387–396. doi: [10.1016/j.cell.2008.01.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.017) PMID: [18267071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18267071/)
23. Kaiya H, Miura T, Matsuda K, Miyazato M, Kangawa K. Two functional growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) type 1a and 2a in goldfish, *Carassius auratus*. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 327: 25–39. doi: [10.1016/j.mce.2010.06.004](https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.06.004) PMID: [20558240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20558240/)
24. Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M. Ghrelin receptors in non-mammalian vertebrates. *Front Endocrinol.* 2013; 4: 1–16.
25. Yin Y, Li Y, Zhang W. The growth hormone secretagogue receptor: Its intracellular signaling and regulation. *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 4837–4855. doi: [10.3390/ijms15034837](https://doi.org/10.3390/ijms15034837) PMID: [24651458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24651458/)
26. Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol.* 2006; 494: 528–548. PMID: [16320257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16320257/)
27. Tannenbaum GS, Lapointe M, Beaudet A, Howard AD. Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology.* 1998; 139: 4420–4423. PMID: [9751527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9751527/)
28. Willesen MG, Kristensen P, Rømer J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology.* 1999; 70: 306–316. PMID: [10567856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10567856/)
29. Hoskins LJ, Volkoff H. Daily patterns of mRNA expression of two core circadian regulatory proteins, Clock2 and Per1, and two appetite-regulating peptides, OX and NPY, in goldfish (*Carassius auratus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2012; 163: 127–136. doi: [10.1016/j.cbpa.2012.05.197](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.05.197) PMID: [22643337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22643337/)
30. Tinoco AB, Nisembaum LG, de Pedro N, Delgado MJ, Isorna E. Leptin expression is rhythmic in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). Role of feeding time. *Gen Comp Endocrinol.* 2014; 204: 239–247. doi: [10.1016/j.ygcen.2014.06.006](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.06.006) PMID: [24932715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24932715/)
31. Yildiz BO, Suchard MA, Wong M-L, McCann SM, Licinio J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 10434–10439. PMID: [15231997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15231997/)
32. Volkoff H, Canosa LF, Unniappan S, Cerdá-Reverter JM, Bernier NJ, Kelly SP, et al. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen Comp Endocrinol.* 2005; 142: 3–19. PMID: [15862543](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15862543/)
33. Lin X, Volkoff H, Narnaware Y, Bernier NJ, Peyon P, Peter RE. Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2000; 126: 415–434. PMID: [10989336](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10989336/)
34. Unniappan S, Peter RE. In vitro and in vivo effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. *Amer J Physiol. Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 286: R1093–R1101.



35. Matsuda K, Miura T, Kaiya H, Maruyama K, Shimakura S-I, Uchiyama M, et al. Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish. *Peptides*. 2006; 27: 2321–2325. PMID: [16687192](#)
36. Matsuda K, Miura T, Kaiya H, Maruyama K, Uchiyama M, Kangawa K, et al. Stimulatory effect of n-octanoylated ghrelin on locomotor activity in the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides*. 2006; 27: 1335–1340. PMID: [16297501](#)
37. Nisembaum LG, de Pedro N, Delgado MJ, Isorna E. Crosstalking between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *Gen Comp Endocrinol*. 2014; 205: 287–295. doi: [10.1016/j.ygcen.2014.03.016](#) PMID: [24681192](#)
38. Escobar S, Servili A, Espigares F, Gueguen M-M, Brocal I, Felip A, et al. Expression of kisspeptins and kiss receptors suggests a large range of functions for kisspeptin systems in the brain of the European sea bass. *PLoS ONE*. 2013; 8: e70177. doi: [10.1371/journal.pone.0070177](#) PMID: [23894610](#)
39. Diotel N, Servili A, Gueguen M-M, Mironov S, Pellegrini E, Vaillant C, et al. Nuclear progesterone receptors are up-regulated by estrogens in neurons and radial glial progenitors in the brain of zebrafish. *PLoS ONE*. 2011; 6: e28375. doi: [10.1371/journal.pone.0028375](#) PMID: [22140581](#)
40. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. 2001; 25: 402–408.
41. Delgado MJ, Alonso-Gómez AL, Gancedo B, de Pedro N, Valenciano AI, Alonso-Bedate M. Serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity and melatonin levels in the frog retina are not correlated during the seasonal cycle. *Gen Comp Endocrinol*. 1993; 92: 143–150. PMID: [8282167](#)
42. Koukkari W, Sothorn R. Chronobiometry: analyzing for rhythms. *Introducing Biological Rhythms*. New York: Springer Science; 2006. pp. 577–602.
43. Peter RE, Gill VE. A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of the goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol*. 1975; 159: 69–101. PMID: [1088950](#)
44. Neglia S, Arcamone N, Esposito V, Gargiulo G, de Girolamo P. Presence and distribution of ghrelin-immunopositive cells in the chicken gastrointestinal tract. *Acta Histochem*. 2005; 107: 3–9. PMID: [15866281](#)
45. Kaslin J, Nystedt JM, Ostergård M, Peitsaro N, Panula P. The orexin/hypocretin system in zebrafish is connected to the aminergic and cholinergic systems. *J Neurosci*. 2004; 24: 2678–2689. PMID: [15028760](#)
46. Panula P. Hypocretin/orexin in fish physiology with emphasis on zebrafish. *Acta Physiol* 2010; 198: 381–386.
47. Cerdá-Reverter JM, Anglade I, Martínez-Rodríguez G, Mazurais D, Muñoz-Cueto JA, Carrillo M, et al. Characterization of neuropeptide Y expression in the brain of a perciform fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Chem Neuroanat*. 2000; 19: 197–210. PMID: [11036237](#)
48. Kah O, Pontet A, Danger JM, Dubourg P, Pelletier G, Vaudry H, et al. Characterization, cerebral distribution and gonadotropin release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiol Biochem*. 1989; 7: 69–76. doi: [10.1007/BF00004691](#) PMID: [24221756](#)
49. Miura T, Maruyama K, Shimakura S-I, Kaiya H, Uchiyama M, Kangawa K, et al. Regulation of food intake in the goldfish by interaction between ghrelin and orexin. *Peptides*. 2007; 28: 1207–1213. PMID: [17481778](#)
50. Guan J-L, Wang Q-P, Kageyama H, Takenoya F, Kita T, Matsuoka T, et al. Synaptic interactions between ghrelin- and neuropeptide Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Peptides*. 2003; 24: 1921–1928. PMID: [15127943](#)
51. Miura T, Maruyama K, Shimakura S-I, Kaiya H, Uchiyama M, Kangawa K, et al. Neuropeptide Y mediates ghrelin-induced feeding in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci Lett*. 2006; 407: 279–283. PMID: [16979293](#)
52. Kitazawa T, Itoh K, Yaosaka N, Maruyama K, Matsuda K, Teraoka H et al. Ghrelin does not affect gastrointestinal contractility in rainbow trout and goldfish *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol*. 2012; 178: 539–545. doi: [10.1016/j.ygcen.2012.06.025](#) PMID: [22776445](#)
53. Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K, Peter RE, Unniappan S. Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comp Biochem Physiol A* 2008; 149: 109–128.
54. LeSauter J, Hoque N, Weintraub M, Pfaff DW, Silver R. Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 13582–13587. doi: [10.1073/pnas.0906426106](#) PMID: [19633195](#)
55. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72: 517–549. doi: [10.1146/annurev-physiol-021909-135821](#) PMID: [20148687](#)

56. Tsang AH, Barclay JL, Oster H. Interactions between endocrine and circadian systems. *J Mol Endocrinol*. 2013; 52: R1–R16. doi: [10.1530/JME-13-0118](https://doi.org/10.1530/JME-13-0118) PMID: [23997239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23997239/)
57. Falcón J, Migaud H, Muñoz-Cueto JA, Carrillo M. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol*. 2010; 165: 469–482. doi: [10.1016/j.ygcen.2009.04.026](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.026) PMID: [19409900](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19409900/)
58. Feliciano A, Vivas Y, de Pedro N, Delgado MJ, Velarde E, Isorna E. Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J Biol Rhythms*. 2011; 26: 24–33. doi: [10.1177/0748730410388600](https://doi.org/10.1177/0748730410388600) PMID: [21252363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21252363/)
59. Sánchez-Breña A, Gueguen M-M, Cano-Nicolau J, Kah O, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ, et al. Anatomical distribution and daily profile of *gper1b* gene expression in brain and peripheral structures of goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol Int*. 2015; 32: 889–902. doi: [10.3109/07420528.2015.1049615](https://doi.org/10.3109/07420528.2015.1049615) PMID: [26171989](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26171989/)
60. Velarde E, Haque R, Iuvone PM, Azpeleta C, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ. Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of period and cryptochrome transcripts in retina, liver, and gut. *J Biol Rhythms*. 2009; 24: 104–113. doi: [10.1177/0748730408329901](https://doi.org/10.1177/0748730408329901) PMID: [19346448](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19346448/)
61. Nisembaum LG, Velarde E, Tinoco AB, Azpeleta C, de Pedro N, Alonso-Gómez AL, et al. Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol Int*. 2012; 29: 665–673. doi: [10.3109/07420528.2012.686947](https://doi.org/10.3109/07420528.2012.686947) PMID: [22734567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22734567/)
62. López-Patiño MAL, Rodríguez-Illamola A, Conde-Sieira M, Soengas JL, Míguez JM. Daily rhythmic expression patterns of *clock1a*, *bmal1*, and *per1* genes in retina and hypothalamus of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Chronobiol Int*. 2011; 28: 381–389. doi: [10.3109/07420528.2011.566398](https://doi.org/10.3109/07420528.2011.566398) PMID: [21721853](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21721853/)
63. Martín-Robles AJ, Whitmore D, Sánchez-Vázquez FJ, Pendón C, Muñoz-Cueto JA. Cloning, tissue expression pattern and daily rhythms of *Period1*, *Period2*, and *Clock* transcripts in the flatfish Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *J Comp Physiol B*. 2012; 182: 673–685. doi: [10.1007/s00360-012-0653-z](https://doi.org/10.1007/s00360-012-0653-z) PMID: [22373774](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22373774/)



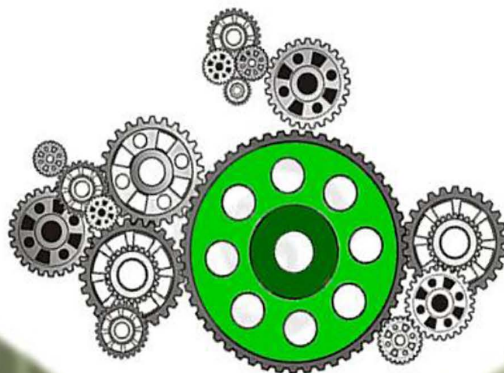
**S1. Fig. Specificity of *preproghrelin* and *ghs-r1a* mRNA riboprobes and the antibody anti-human ghrelin.** A, B. Anterior intestine showing *preproghrelin* antisense riboprobes signaling (arrowheads) surrounding the nucleus. C. Anterior intestine showing *preproghrelin* sense riboprobes staining. D, E. Telencephalon showing *ghs-r1a* antisense riboprobes signaling (arrowheads) staining. F. Telencephalon showing *ghs-r1a* sense riboprobes staining. G. Antibody anti- human ghrelin cytoplasmic signal (arrowheads) in the anterior intestine. H. Control anterior intestine without the primary antibody, incubated only with the secondary one. #: Blood cells with unspecific staining.



## Capítulo 2

### El hígado como oscilador endógeno en el carpín (*Carassius auratus*):

Señales hormonales que modifican genes reloj en el hígado del carpín





## Capítulo 2

### **El hígado como oscilador endógeno en el carpín (*Carassius auratus*): Señales hormonales que modifican genes reloj en el hígado del carpín.**

#### **2.1. La ghrelina como reguladora de genes reloj en el hígado cultivado del carpín.**

*Role of ghrelin as modulator of clock genes expression in the liver of goldfish (Carassius auratus) in vitro: actions via PLC-PKC and AC-PKA pathways. Enviado a Journal of Experimental Biology*

#### **2.2. Glucocorticoides como reguladores de genes reloj en el hígado cultivado del carpín.**

*A) Performing a hepatic timing signal: glucocorticoids induce gper1a and gper1b expression and repress gclock1a and gbm1a in the liver of goldfish. Journal of Comparative Physiology. Part B. (2015) 186(1): 73-82*

*B) Clock genes expression in liver of goldfish in vivo, in vitro and synchronization by glucocorticoids. En preparación para enviar a Journal of Comparative Physiology. Part B.*

#### **2.3. El oscilador hepático en carpín dorado. Modificaciones por el ciclo luz oscuridad, el horario de alimentación y hormonas.**

*The liver as a component of the circadian system: integrating a network of signals. General and Comparative Endocrinology (2015) 221: 213–216.*



## **RESUMEN**

El segundo capítulo está dedicado a la investigación de las señales hormonales como vías de entrada del sistema circadiano del carpín, centrándose en la ghrelina y los glucocorticoides. Así, el presente capítulo consta de tres partes. La primera de ellas dedicada al efecto de la ghrelina como modulador de genes reloj en hígado *in vitro* como ejemplo de vía de señalización relacionada con la regulación de la ingesta y el metabolismo energético. La segunda dedicada al análisis del efecto de los glucocorticoides como moduladores de los genes reloj en carpín debido a que su papel como vía de salida del oscilador está muy bien caracterizada en vertebrados, ya que es el primer paso para conocer cómo el estrés puede afectar al sistema circadiano, afectando por tanto a la homeostasis temporal. Y una tercera parte dedicada a la realización de una revisión exhaustiva de la información disponible hasta la actualidad de la regulación del oscilador hepático del carpín dorado recogiendo todas las señales de entrada al oscilador estudiadas hasta el momento.

### **1. Estudio de la ghrelina como modulador de los genes reloj en el hígado del carpín.**

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación recientemente han puesto de manifiesto una regulación de los genes reloj en el hígado del carpín una hora después de haber sido tratados con ghrelina (Nisembaum et al., 2014b). Además, resultados previos de la presente Tesis Doctoral muestran un perfil rítmico de la expresión tanto de la propia ghrelina como de su receptor en el hipotálamo, y de ésta en su principal lugar de síntesis, el tracto gastrointestinal. Así pues nos preguntamos si es la ghrelina en sí misma una señal directamente reconocida por el hígado capaz de modificar su oscilador molecular.

### **2. Estudio de los glucocorticoides como moduladores de los genes reloj en el hígado del carpín.**

#### **2.1. A corto plazo.**

Recientemente se ha estudiado el efecto de los glucocorticoides sobre el oscilador hepático en mamíferos describiéndose la sensibilidad de dichos genes, especialmente los representantes de la familia *per* a las oscilaciones de los niveles de estas hormonas. En esta parte de la Tesis estudiamos si los glucocorticoides, principal señal de estrés en vertebrados, es capaz de modular la expresión de genes reloj también en el carpín, tanto *in vivo*, como *in vitro*.

#### **2.2 A largo plazo. Sincronización por glucocorticoides.**

A continuación nos preguntamos en primer lugar si existe ritmicidad diaria en los niveles de cortisol endógenos del carpín dorado y, de ser así, si los glucocorticoides podrían considerarse una entrada del sistema circadiano capaz no solo de una modificación puntual del oscilador hepático sino también de una resincronización del mismo tras una exposición a condiciones de curso libre.





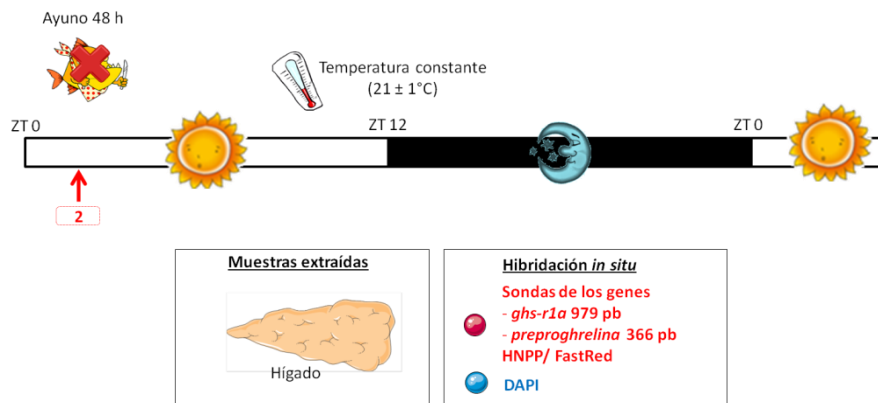
## 2.1. La ghrelina como reguladora de genes reloj en el hígado cultivado del carpín.

*Role of ghrelin as modulator of clock genes expression in the liver of goldfish (Carassius auratus) in vitro: actions via PLC-PKC and AC-PKA pathways. Enviado a Journal of Experimental Biology*

### DISEÑOS EXPERIMENTALES

#### 1. Presencia de receptores de ghrelina en el hígado del carpín.

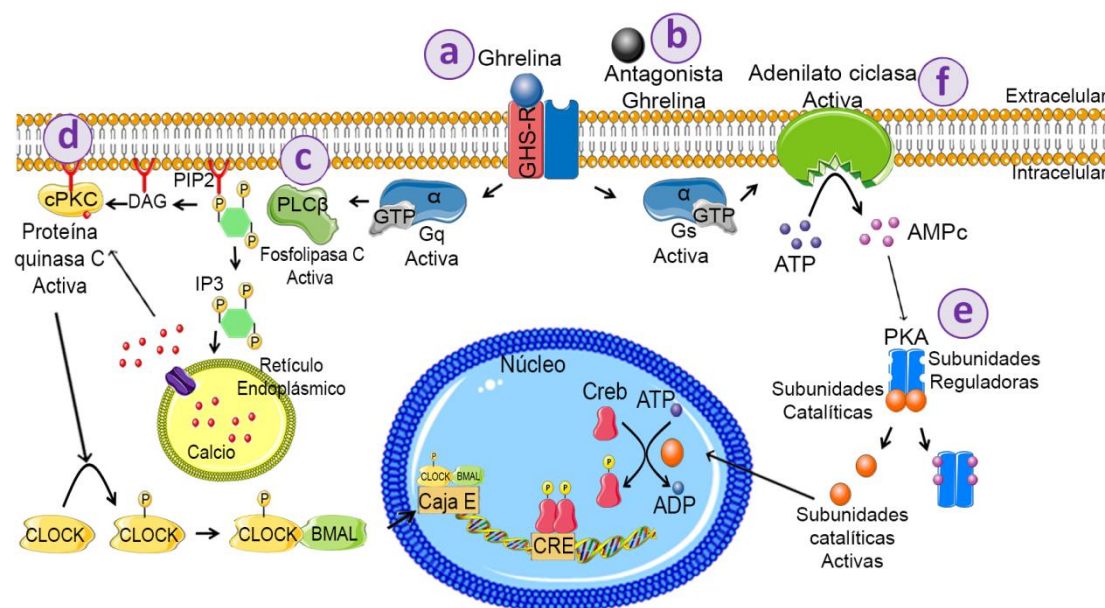
Con el fin de averiguar si la ghrelina actuaba directamente sobre el hígado del carpín para modular los genes reloj, el primer paso fue demostrar la presencia de receptores específicos para esta hormona. Para ello, los animales permanecieron en ayunas 48 h. El día del experimento, se anestesiaron con fenoxietanol (1 ml/l) y se fijaron con paraformaldehído al 4% a ZT 2 (considerándose ZT 0 el momento del encendido de las luces) extrayéndose muestras de hígado. A continuación se llevó a cabo la hibridación *in situ* en todas las muestras con la sonda antisentido y sentido (control negativo) para el transcrito *ghs-r1a* (Figura C2.1).



**Figura C2.1.** Diseño experimental para el estudio de la distribución de *ghs-r1a* en el hígado del carpín. Se tomaron muestras de hígado de carpines mantenidos en condiciones de aclimatación en ayunas durante 48 h en ZT 2. La hibridación *in situ* se realizó mediante el uso de sondas sentido y antisentido de 979 pb de *ghs-r1a*.

## 2. Efecto de la ghrelina como modulador de los genes reloj en hígado *in vitro* y de la vía de señalización intracelular implicada.

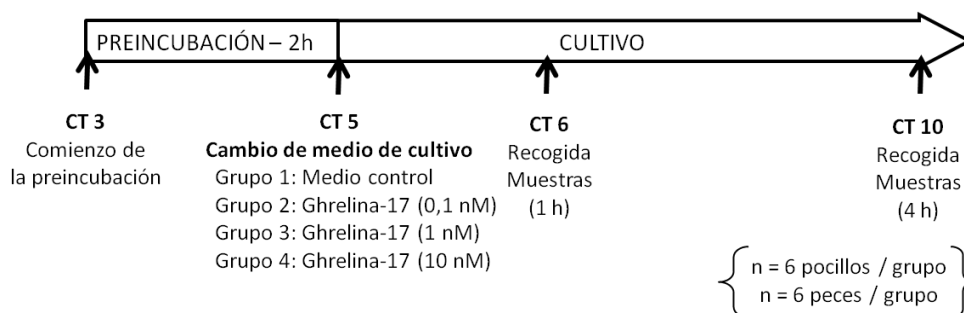
Se estudió, la acción directa de la ghrelina sobre la expresión de genes reloj en el hígado del carpín, así como los efectos de un antagonista de la hormona. En la figura C.2.2 se muestra un esquema de los fármacos empleados en este estudio en el que cada letra indica dónde afectan en la cascada de señalización cada uno de los diferentes fármacos que se han empleado. Los diseños experimentales concretos con cada fármaco se detallan a continuación en el texto y en los siguientes esquemas. En todos los casos los animales se mantuvieron bajo condiciones de fotoperiodo 12L:12D y alimentación a ZT 2. El día del experimento, los animales se sacrificaron a ZT 2 (en ayunas) para proceder a la extracción del hígado y comenzar los cultivos. En todos los caso se dejó el tejido preincubando para su estabilización 2 horas antes de comenzar los tratamientos. A lo largo de todos los experimentos de cultivos, se utiliza el término CT (*circadian time*) como equivalente al horario en ZT pero en ausencia de señales sincronizadoras, es decir, CT 0 corresponde con ZT 0 (considerándose CT 0 el momento del encendido de las luces antes del sacrificio de los animales).



**Figura C2.2. Estudio de la ghrelina como modulador de los genes reloj del hígado de carpín en cultivo.** Cada letra indica dónde afectan en la cascada de señalización los diferentes fármacos que se han empleado. a: Estudio concentración-respuesta con ghrelina. b: Empleo de un antagonista de ghrelina ([D-Lys<sup>3</sup>] GRPH-6). c: Inhibidor de la PLC (U73122). d: Empleo de un inhibidor y un activador de la PKC (Chelerritrina y PMA, respectivamente). e: Inhibidor de la PKA (H89). f: Empleo de un activador de la adenilato ciclasa (forskolin).

- Experimento concentración-respuesta de ghrelina-17.

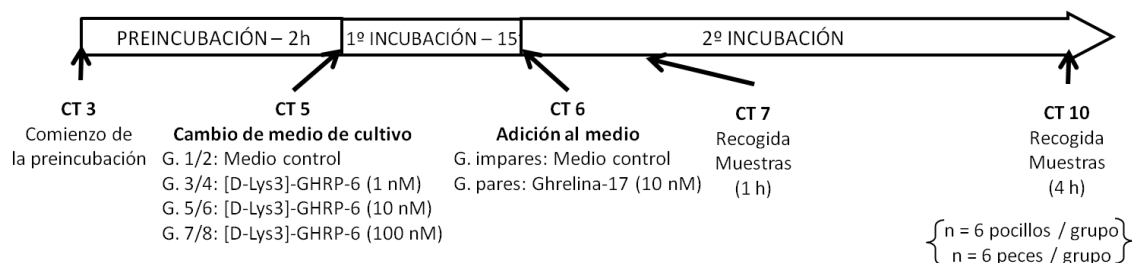
Los hígados se cultivaron en presencia o ausencia de ghrelina (0,1, 1 y 10 nM) durante 1 o 4 h (Figura C2.2.a, Figura C2.3).



**Figura C2.3. Diseño experimental para el estudio de la curva concentración-respuesta de ghrelina en hígados cultivados de carpín.** Los hígados se preincubaron 2 h en presencia de medio control para estabilizar el tejido tras la extracción. Posteriormente se cambió el medio por medio control o suplementado con ghrelina (0,1, 1 o 10 nM) y se mantuvieron en estas condiciones 1 o 4 h. Se considera CT 0 el momento del encendido de las luces antes del sacrificio de los animales.

- Estudio de la implicación de los receptores de ghrelina GHS-R1a en la acción de la hormona sobre la expresión de los genes reloj.

Los hígados se cultivaron en presencia o ausencia de un antagonista de ghrelina ([D-Lys<sup>3</sup>]-GRPH-6; 1, 10 y 100 nM) durante 15 min, tras lo cual se añadió medio de cultivo control o suplementado con ghrelina a una concentración de 10 nM y se cultivaron durante 1 o 4 h (Figura C2.2.b y C2.4).



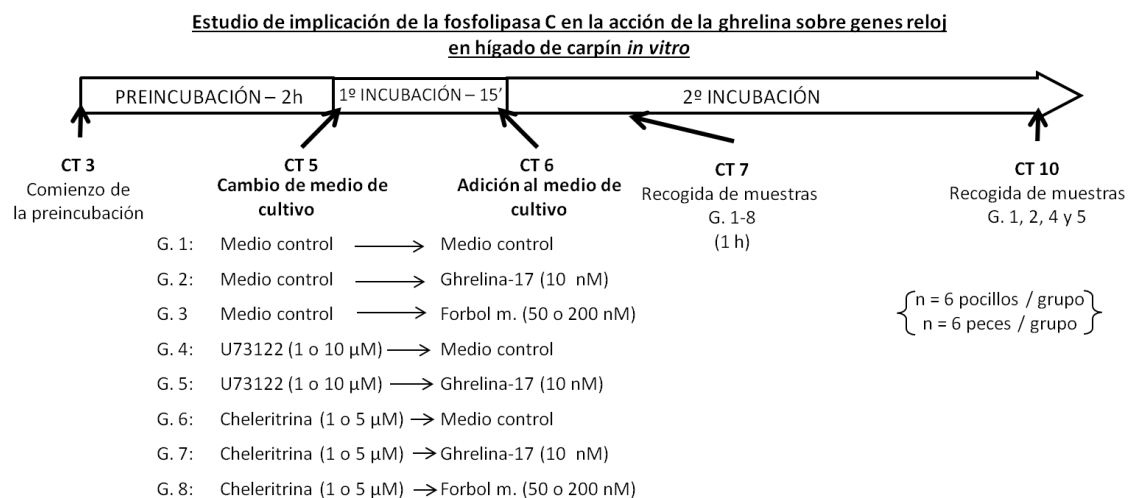
**Figura C2.4. Diseño experimental para el estudiar cómo afecta la presencia de un antagonista de ghrelina al efecto de la hormona sobre los genes reloj en hígado cultivado.** Tras la preincubación de 2 h para estabilizar el tejido tras la extracción, se incuban 15 min las muestras en presencia o ausencia del antagonista de los receptores de ghrelina, [D-Lys-3]-GHRP-6 (1, 10 o 100 nM) y, posteriormente se añade a cada grupo medio control o suplementado con ghrelina 10 nM y se incuban durante 1 o 4 h. Se considera CT 0 el momento del encendido de las luces antes del sacrificio de los animales.

- Estudio de la posible vía de transducción intracelular responsable de la modulación de los genes reloj por acción de la ghrelina.

Además para estudiar las posibles vías de transducción implicadas en la modulación de genes reloj debida a la ghrelina mediante aproximaciones *in vitro*, se emplearon diversos fármacos activadores o inhibidores de las vías PLC-PKC y AC-PKA.

### 1) Estudio de la vía PLC-PKC.

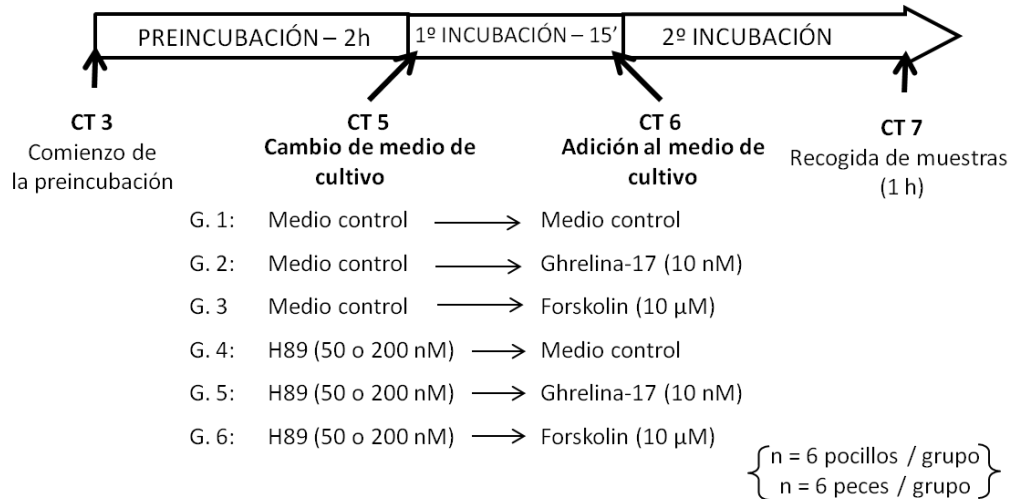
Se estudió el efecto de una inhibición de la PLC, (U73122; 1-10  $\mu$ M) o de la PKC (Chelerritrina; 1 y 5  $\mu$ M). En ambos ensayos, se incubó durante 15 minutos con el inhibidor correspondiente y a continuación se añadió medio de cultivo control o suplementado con ghrelina (10 nM) y se incubó durante 1 h (experimentos con U73122 y chelerritrina) ó 4 h (experimento con U73122) como se observa en la figura C2.5. Asimismo, se estudió el efecto de la activación de la PKC en la expresión de genes reloj mediante el uso de un activador de la PKC (Forbol miristato) a diferentes concentraciones (50 o 200 nM) que se añadió a hígados previamente incubados en presencia o ausencia de chelerritrina (1 o 5  $\mu$ M) y se cultivaron durante 1 h (Figura C2.5).



**Figura C2.5. Experimentos para el estudio de la posible implicación de la vía PLC-PKC como transductora del efecto de la ghrelina sobre los genes reloj en hígado en cultivo.** Tras la preincubación de 2 h para estabilizar el tejido tras la extracción, se incuban 15 min las muestras en presencia o ausencia del inhibidor de la PLC, U73122 (1 o 10  $\mu$ M) o del inhibidor de la PKC, chelerritrina (1 o 5  $\mu$ M) y, posteriormente se añade a cada grupo medio control, suplementado con ghrelina (10 nM) o con forbol miristato (50 o 200 nM) y se incuban durante 1 o 4 h (solamente en el caso del estudio del efecto del U73122). Se considera CT 0 el momento del encendido de las luces antes del sacrificio de los animales.

## 2) Estudio de la vía AMPc-PKA.

Se cultivó hígado en presencia o ausencia de un inhibidor de la PKA (H89) a diferentes concentraciones (50 o 200  $\mu$ M) durante 15 minutos tras los cuales se añadió a las muestras medio control o en presencia de ghrelina (10 nM) y se incubaron durante 1 h (Figura C2.5). Asimismo, se estudió el efecto del forskolin, activador de la AC. Para ello, se incubaron las muestras en ausencia o presencia de H89 (50 o 200  $\mu$ M) tras lo cual se añadió medio control o medio suplementado con forskolin (10  $\mu$ M) y se incubaron durante 1 h (Figura C2.6).



**Figura C2.6. Experimentos para el estudio de la posible implicación de la vía AMPc-PKA como transductora del efecto de la ghrelina sobre los genes reloj en hígado en cultivo.** Tras la preincubación de 2 h para estabilizar el tejido tras la extracción, se incuban 15 min las muestras en presencia o ausencia del inhibidor de la PKA, H89 (50 o 200 nM) y, posteriormente se añade a cada grupo medio control, suplementado con ghrelina (10 nM) o con forskolin (10  $\mu$ M) y se incuban durante 1 h. Se considera CT 0 el momento del encendido de las luces antes del sacrificio de los animales.



## Role of ghrelin as modulator of clock genes expression in the liver of goldfish (*Carassius auratus*) *in vitro*: involvement of PLC-PKC and AC-PKA pathways.

A. Sánchez-Bretaña<sup>1</sup>, A. M. Blanco<sup>1</sup>, Á. L. Alonso-Gómez<sup>1</sup>, M. J. Delgado<sup>1</sup>, O. Kah<sup>2</sup>, E. Isorna<sup>1\*</sup>

1. Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. 2. Neuroendocrine Effects of Endocrine Disruptors, Inserm (Research Institute for Health, Environment and Occupation, IRSET, INSERM U1085), SFR Biosit Université de Rennes 1, Rennes, France.

\*Author of correspondance (e-mail): eisornaa@bio.ucm.es

MANUSCRITO ENVIADO A PUBLICAR EN *Journal of Experimental Biology*

### SUMMARY

Liver is the most important link between the circadian system and metabolism, which works as an oscillator regulated by different endogenous signals. Ghrelin is an orexigenic peptide synthesized in the gastrointestinal tract in vertebrates that acts through specific membrane receptors, being GHS-R1a the most studied. The objectives of the present study were first, to study the presence of ghrelin receptors in the liver of goldfish, and second to investigate the ghrelin signaling pathway in the regulation of clock genes expression in the hepatic oscillator in goldfish by *in vitro* approaches. Ghrelin receptor transcript, *ghs-r1a*, is present in the majority of the hepatic cells. In cultured liver ghrelin induces the expression of the positive (*gbmalla*, *gclock1a*) and negative elements (*gper1a*, *gper1b*, *gper2a*, *gper3*) of the main loop of the molecular clock machinery as well as *grev-erbα* from the auxiliary loop.

Moreover, this effect is completely blocked by the preincubation with an antagonist of ghrelin receptor, [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6. Incubation of liver with a PLC inhibitor (U73122), a PKC activator (phorbol 12-myristate 13-acetate) and a PKC inhibitor (chelerythrine chloride) demonstrate that the PLC-PKC pathway mediates such ghrelin actions. In addition, studies with an AC activator (forskolin) and a PKA inhibitor (H89) show that *gbmalla* and *grev-erbα* are also induced by a ghrelin-evoked cAMP rise in the cells. Taken together, present results show for the first time in vertebrates a direct action of ghrelin on hepatic clock genes, supporting the role of this hormone as a temporal messenger.

**Key words:** ghrelin, ghrelin receptor, clock genes, PLC, PKC, cAMP, adenylyl cyclase, PKA, liver, fish.

### INTRODUCTION

The circadian system controls physiological rhythms that let organisms to anticipate cyclic environmental changes. In vertebrates, these endogenous timing system is formed by multiple coupled central and peripheral oscillators that are entrained by environmental cues (Albrecht, 2012; Tsang et al., 2014). The molecular basis of these oscillators is well conserved among vertebrates (Dunlap, 1999; Panda et al., 2002) and consists of interlocked autoregulatory feedback loops of the known as clock genes. The positive limb of the main loop includes *clock* and *bmal1* genes (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput, and Brain and

Muscle ARNT-Like 1, respectively). They form the heterodimer CLOCK-BMAL1 that activates the transcription of the negative elements, *Per* (*Period*) and *Cry* (*Cryptochrome*) clock genes, whose protein products inhibit CLOCK-BMAL1 transactivation (Hastings et al., 2007; Nader et al., 2010; Schibler et al., 2015). This main auto-regulatory loop is stabilized by an auxiliary loop formed by *Rev-erbα* (V-erbA-related protein EAR-1) and *Ror* (Retinoic acid related orphan receptor) genes, which mainly modulates *Bmal1* expression (Nader et al., 2010; Schibler et al., 2015).



The fact that, besides the light-dark, feeding cycle may act as a potent synchronizer of locomotor activity daily rhythms in vertebrates (including teleost species) is well known since time ago (Bechtold, 2008; Madrid et al., 2001; Mistleberger, 2011; Sánchez-Vázquez and Madrid, 2001; Spieler, 1992; Stephan, 2002). However, which food related signal(s) entrains the molecular clocks of the circadian system (known as Food Entrained Oscillators, FEOs) remains unknown. In mammals, the different oscillators of the circadian system respond with different sensitivities to feeding inputs, being the liver one of the most sensitive peripheral oscillators (Albrecht, 2012; Damiola et al., 2000; Reddy et al., 2007; Schibler et al., 2015; Schmutz et al., 2012; Sujino et al., 2012). In teleosts, the scarce studies available to date, including goldfish (*Carassius auratus*), suggest that as in mammals, the liver acts as an oscillator that can be synchronized by photoperiod and feeding schedule (del Pozo et al., 2012; Feliciano et al., 2011; López-Olmeda et al., 2010; Martín-Robles et al., 2011; Sánchez-Bretaña et al., 2015a and 2015b; Tinoco et al., 2014; Vera et al., 2013). Moreover, it is highly sensitive to feeding cycles and food related signals (del Pozo et al., 2012; Feliciano et al., 2011; López-Olmeda et al., 2010; Vera et al., 2013; Sánchez-Bretaña et al., 2015b).

Ghrelin is a peripheral orexigenic peptide hormone involved in energy balance by promoting food intake, carbohydrate utilization and adiposity (Abizaid and Horvath, 2012; Delporte, 2013), although it also exerts a wide variety of physiological functions in the organism (Delporte, 2013; Sato et al., 2012). This hormone has a daily rhythm in the mice stomach ghrelin expression (LeSauter et al., 2009), rat hypothalamus and plasma (Bodosi et al., 2004; Patton et al., 2014). and it is also rhythmically expressed in the hypothalamus, pituitary and anterior intestine of goldfish (Sánchez-Bretaña et al., 2015c). Such hormonal rhythms have been related mainly with feeding-fasting rhythms, and in fact ghrelin is considered an output of the FEOs that could drives Food Anticipatory Activity (FAA, LeSauter et al., 2009; Nisembaum et al., 2014b;

Patton et al., 2014). Moreover, it has been proposed that this hormone could also act as an input of circadian clocks, signalling feeding-fasting rhythms. However, to date there are few evidences that support such role of ghrelin. In mouse, it is able to phase advance or delay the rhythm of spontaneous firing and clock gene expression *in vivo* and in cultured mouse suprachiasmatic nuclei (Yannielli et al., 2007; Zhou et al., 2014). On the other hand, in goldfish, ghrelin induces *per* gene expression in hypothalamus and liver 1 hour after an intraperitoneal administration (Nisembaum et al., 2014b).

Ghrelin action is mediated by G-protein coupled receptors known as growth hormone secretagogue receptors (GHS-R), or also ghrelin receptors (Kaiya et al., 2013; Kojima et al., 1999a). In otophysi teleosts, two paralog *ghs-r* genes have been identified (GHS-R1 and GHS-R2), which has been tetraploidized in cyprininae resulting in the presence of four subtypes of receptors in goldfish (GHS-R1a1, GHS-R1a2, GHS-R2a1 and GHS-R2a2, Kaiya et al., 2010). Among the different GHS-R, GHS-R1a seems to be involved in many of the physiological actions of ghrelin (Gnanapavan et al., 2002; Kaiya et al., 2013; Yin et al., 2014). This receptor is mainly couple to the phospholipase C (PLC)- protein kinase C (PKC) pathway (Kojima et al., 1999b; Yin et al., 2014), but it acts also via other intracellular molecular pathways, including the adenylyl cyclase (AC)-protein kinase A (PKA) pathway (Kohn et al., 2003). Recently the anatomical distribution of the GHS-R1a expression in forebrain and gut of goldfish has been described (Sánchez-Bretaña et al., 2015c). Such distribution coincides with the location of the clock gene *per1b* (Sánchez-Bretaña et al., 2015a; Sánchez-Bretaña et al., 2015c), giving an anatomical support for a putative role of ghrelin as an input of circadian clocks in this species.

Then, because the special relevance in the synchronization of the liver to feeding inputs in mammals and fish, and the role of ghrelin as a signal of feeding-fasting cycles, the aim of the present study was to investigate if ghrelin regulates directly the hepatic molecular clock in goldfish.

Firstly, we have reported the expression of the ghrelin receptor GHS-R1a by *in situ* studies in the liver of this species. Secondly, we have demonstrated that ghrelin affects clock genes expression (*gper1a*, *gper1b*, *gper2a*, *gper3*, *gbmalla*, *gclock1a* and *grev-erbα*) in this organ *in vitro* in a concentration-response dependent way, and that the ghrelin antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 counteracts this effect. Finally, we have investigated which is the intracellular pathway (PKA and PKC) through which ghrelin exerts clock genes regulation on the goldfish hepatic clock, providing by first time in any vertebrate, a molecular mechanism by which ghrelin acts as an input of the circadian clocks.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals, sampling and culture conditions

For the anatomical experiments, goldfish ( $2.0 \pm 0.5$  g;  $n=7$ ) obtained from a local supplier (Rennes, France) were maintained in 60 l aquaria with filtered and aerated fresh water ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) under a 12 h light: 12 h darkness (12L:12D) photoperiod (lights on at 9 AM). Fish were daily fed at 11 AM (*zeitgeber* time, ZT 2) with food pellets (1% body weight (b.w.); Novo GranoMix, JBL, GmbH & Co., Neuhofen, Germany). Goldfish (48 h fasted) were anesthetized at ZT 2 with phenoxyethanol 1 ml/l (ICN Biomedicals Inc., Irvine, CA, USA) and sacrificed. Then, the whole fish was immersed overnight in 4% paraformaldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4). The following day, the liver was removed and post-fixed 3 h in the same solution. Then, the samples were cryoprotected overnight with 30% sucrose (MP Biomedical, LLC, Illkirch, France), included in the frozen section medium Richard-Allan Scientific<sup>TM</sup> Neg-50 (Thermo Shandon Scientific, Cheshir, UK) and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Fish handling procedures complied with International Standards for the Care and Use of Laboratory Animals and were in accordance with the Guidelines of the European Union Council (2010/63/EU) for the use of research animals.

For culture studies, goldfish ( $7.2 \pm 0.5$  g) obtained from a local supplier (Madrid, Spain), were maintained in 60 l aquaria with filtered

and aerated fresh water ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) under a 12 h light: 12 h darkness (12L:12D) photoperiod (lights on at 8 AM). Fish were daily fed at ZT 2 with food pellets (1% b.w.; Bioflakes, Sera Pond, Heidelberg, Germany). The day of the experiment non-fed goldfish were anesthetized in MS-222 (0.175 g/l, Sigma Aldrich, CA, USA) at ZT=2. Then, they were sacrificed and liver was quickly sampled and distributed in different wells (15 mg liver/well) in sterile culture 24-well multidish plates. Liver cultures were performed as previously described (Sánchez-Bretaña et al., 2015d). Only one portion of liver from each fish was employed in each experimental group ( $n=6$  fish/group). Liver portions were always preincubated during 2 h in 1 ml of Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (15 mg liver/ml/well). Then, medium was replaced by 1 ml of fresh DMEM containing the respective vehicle (control groups) or containing the corresponding drug (treated groups). Incubation time vary according to the experiments. The liver cultures were performed under constant dim light and temperature ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) conditions. At the end of the culture time, liver samples were collected, quickly frozen in liquid nitrogen and maintained at  $-80^\circ\text{C}$  until clock gene expression was quantified.

### Localization of *ghs-r1a* gene in the liver of goldfish by *in situ* hybridization (ISH)

The probes for hybridization studies were synthesized from plasmids (pCR<sup>TM</sup>4-TOPO® vector; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing a 979 bp of goldfish *ghs-r1a* that have been previously obtained (Sánchez-Bretaña et al., 2015c). This probe targets a common fragment of goldfish *ghs-r1a1* and *ghs-r1a2* (accession numbers AB504275.1 and AB504276.1). Plasmids with the insert were linearized with *SpeI* and *NotI*. Antisense and sense mRNA probes were obtained with DIG RNA labeling MIX (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) by *in vitro* transcription with T7 and T3 RNA polymerases (Promega, Madison, WI, USA). The specificity of the probes was confirmed with parallel series of slides hybridized with the respective sense RNA probes.

Liver obtained and stored at above described was included in TissueTek and sectioned at 8  $\mu$ m using a cryostat. Sections were mounted onto superfrost slides. The protocol for ISH was performed as previously described (Escobar et al, 2013) with minor modifications. In brief, cryostat sections were washed in PBS two times during 10 min before postfixation in *Antigenfix* (DiaPath, Martinengo, Italy) for 20 min. After washing in PBS, sections were treated for 5 min at 37°C with proteinase K (2  $\mu$ g/ml, Sigma, Steinheim, Germany) diluted in PBS, and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min. Sections were rinsed twice in 2x standard saline citrate (SSC). Hybridization was performed at 65°C overnight in a humidified chamber using 100  $\mu$ l hybridization buffer (50% deionized formamide; 2x SSC; 5x Denhardt's solution; 50  $\mu$ g/ml of yeast tRNA; 4 mM EDTA; 2.5% dextran sulfate) containing the DIG-labeled probe (3  $\mu$ g/ml). After hybridization, slides were washed in 2x SSC at 65°C (2x30 min), 2x SSC/50% formamide at 65°C (2x30 min), 0.2x SSC (1x15 min) and 0.1x SSC (1x15 min) at room temperature. Slides were next washed in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 150 mM NaCl for 10 min, then washed in the same buffer containing 0.1% Triton and 0.5% of skimmed milk powder (2x30 min), and incubated overnight at room temperature with anti-digoxigenin alkaline phosphatase Fab fragments (1:2,000; Roche Pharma, Mannheim, Germany). On the next day, slides were incubated for 4.5 h with an HNPP (2-hydroxy-3-naphthoic acid -2'-phenylanilide phosphate)/FastRED detection kit (Roche Pharma, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. Finally, slides were coverslipped with Vechashield mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Slides were observed with an epifluorescence microscope (Olympus Provis, equipped with a DP71 digital camera). Images were processed with either the Olympus Analysis or Zeiss Cell software. Micrographs were generated in the "TIFF" format and adjusted linearly for light and contrast before being assembled on plates using Photoshop CS6.

## Drugs

Stock solutions were prepared and stored at 4°C until used. The 17-aminoacid isoform of goldfish ghrelin (GTS(Octanoyl)FLSPAQKPQGRRPP; Bachem, Bubendorf, Switzerland) and the PKA inhibitor H89 (Sigma Aldrich, CA, USA) were prepared in stiller water at 2 and 15 mM concentrations, respectively. Stock solutions of the PLC inhibitor U73122 (Tocris Bioscience, Bristol, UK), the ghrelin antagonist [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 (Bachem, Bubendorf, Switzerland) and the AC activator forskolin (Sigma Aldrich, CA, USA) were prepared in absolute ethanol at 1, 10 and 15 mM concentrations, respectively. The PKC inhibitor chelerythrine chloride (CHEL; Sigma Aldrich, CA, USA) and the PKC activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma Aldrich, CA, USA) stock solutions were prepared in DMSO at 5 and 20 mM concentrations, respectively. All the stock solutions were diluted in DMEM (Sigma Aldrich, CA, USA) to reach the required final concentrations just before use.

When the experimental approach includes the use of an antagonist or an inhibitor (i.e. [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6, U73122, CHEL, H89), these drugs were added 15 min before the respective activator of gene expression (ghrelin-17, PMA, forskolin).

## Clock genes expression analysis

Clock genes expression (*gper1a*, *gper1b*, *gper2a*, *gper3*, *gbmalla*, *gclock1a* and *grev-erba*) was measured in all the samples by RT-qPCR using *g $\beta$ -actin* as a reference gene as previously described (Nisembaum et al., 2014a). Specific primers and Gene Data Bank Reference Numbers are shown in Table 1. The RNA extraction (TRI® Reagent method, Sigma Chemical, Madrid, Spain), DNase treatment (Promega, Madison, USA), cDNA synthesis (Invitrogen, Carlsbad, USA) and real-time PCR reactions (iTaQ™ SYBR® Green Supermix in a CFX96™ Real-Time System, Biorad Laboratories, Hercules, USA) were carried out following manufacturer instructions with minor modifications (Nisembaum et al., 2012). Total RNA (1  $\mu$ g) was retrotranscribed and PCR reactions were developed in a final volume of

10 µl (2 µl of cDNA per sample). PCR conditions were 30 seconds at 95°C, and 40 cycles consisting of 5 sec at 95°C and 30 sec at 60°C for all genes. Calibration curves were made with serial dilutions of cDNA, exhibiting efficiencies around 100%. Specificity of amplifications was ensured by melting curves and also tested by agarose gels. The relative mRNA expression was determined by  $\Delta\Delta C_t$  method (Livak and Schmittgen, 2001).

**Table 1.** Accession numbers of the genes of interest and primers sequences used in this study.

Target gene	Accession number		Primer sequences 5' → 3'	product (pb)
<i>gper1a</i>	EF690698	F R	CAGTGGCTCGAATGAGCACCA TGAAGACCTGCTGTCCGTTGG	155
<i>gper1b</i>	KP663726	F R	CTCGCAGCTCCACAAACCTA CACAAACAGCTGCAGAGGAAT	159
<i>gper2a</i>	EF690697	F R	TTTGTCAATCCCTGGAGCCGC AAGGATTGCCCCTCAGCCACG	116
<i>gper3</i>	EF690699	F R	GGCTATGGCAGTCTGGCTAGTAA CAGCACAAAACCGCTGCAATGTC	130
<i>gbmal1a</i>	KF840401	F R	AGATTCTGTTCTGCTCCGGAG ATCGATGAGTCGTTCCCGTG	161
<i>gclock1a</i>	KJ574204	F R	CGATGGCAGCATCTCTTGTGT TCCTGGATCTGCCGACGTTTCAT	189
<i>grev-erba</i>	KU242427	F R	CGTTCATCTCAGGCACCACT AACTGACCTGCAGACACCAG	166
$\beta$ -actin	AB039726	F R	CAGGGAGTGATGGTTGGCA AACACGCAGCTCGTTGTAGA	168

## Statistics

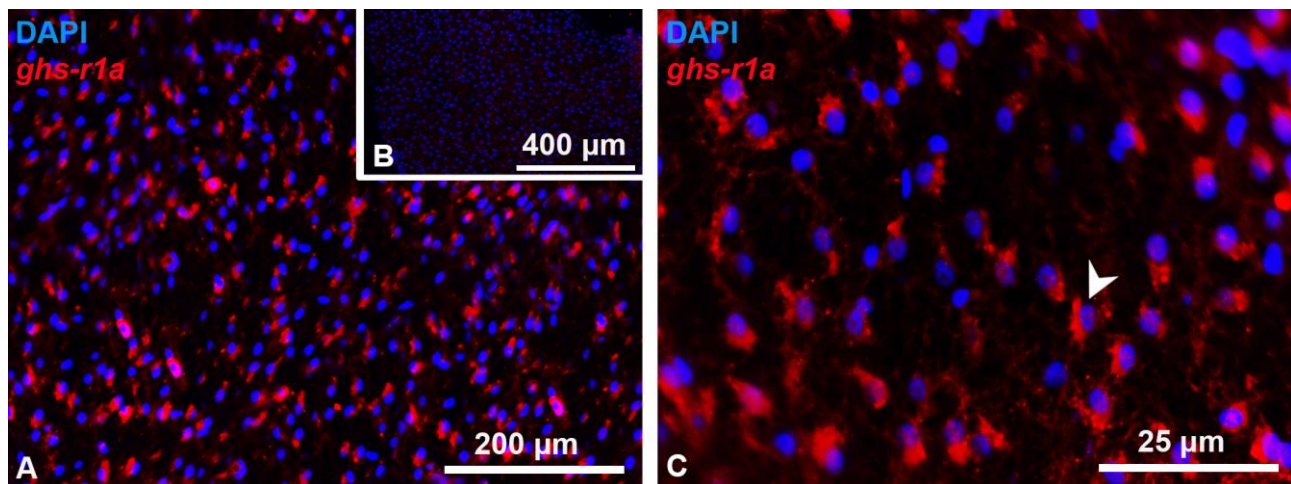
Data obtained from  $\Delta\Delta C_t$  method were transformed with logarithmic function for normalizing the variance and to obtain homocedasticity. A probability level of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

Analysis of the relative expression changes in the ghrelin concentration-response curves was conducted by using one-way ANOVA followed by the post-hoc Student Newman Keuls (SNK) test. A two-way ANOVA followed by the post-hoc SNK was used when both, the interaction of activators (ghrelin-17, PMA, forskolin) and inhibitors ([D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6, U73122, CHEL, H89) were used together.

## RESULTS

### Ghrelin receptor location in the liver of goldfish

Ghrelin receptor *ghs-r1a* expression was widely found in the liver. Almost all the hepatic cells showed strong *ghs-r1a* signal surrounding the nucleus (Fig. 1A, C), while the sense riboprobes yielded no signal (Fig. 1B) supporting the specificity of the obtained signal in the goldfish liver.



**Figure 1.** Transversal representative sections of goldfish liver showing *ghs-r1a* gene positive cells found by *in situ* hybridization. **A.** Liver section showing *ghs-r1a* antisense riboprobe staining surrounding the nucleus in red. **B.** Liver section showing the absence of *ghs-r1a* sense riboprobe staining. **C.** Detail of hepatic nucleus surrounded by red *ghs-r1a* mRNA riboprobe staining (arrowhead).

### Ghrelin as regulator of clock genes expression in cultured liver

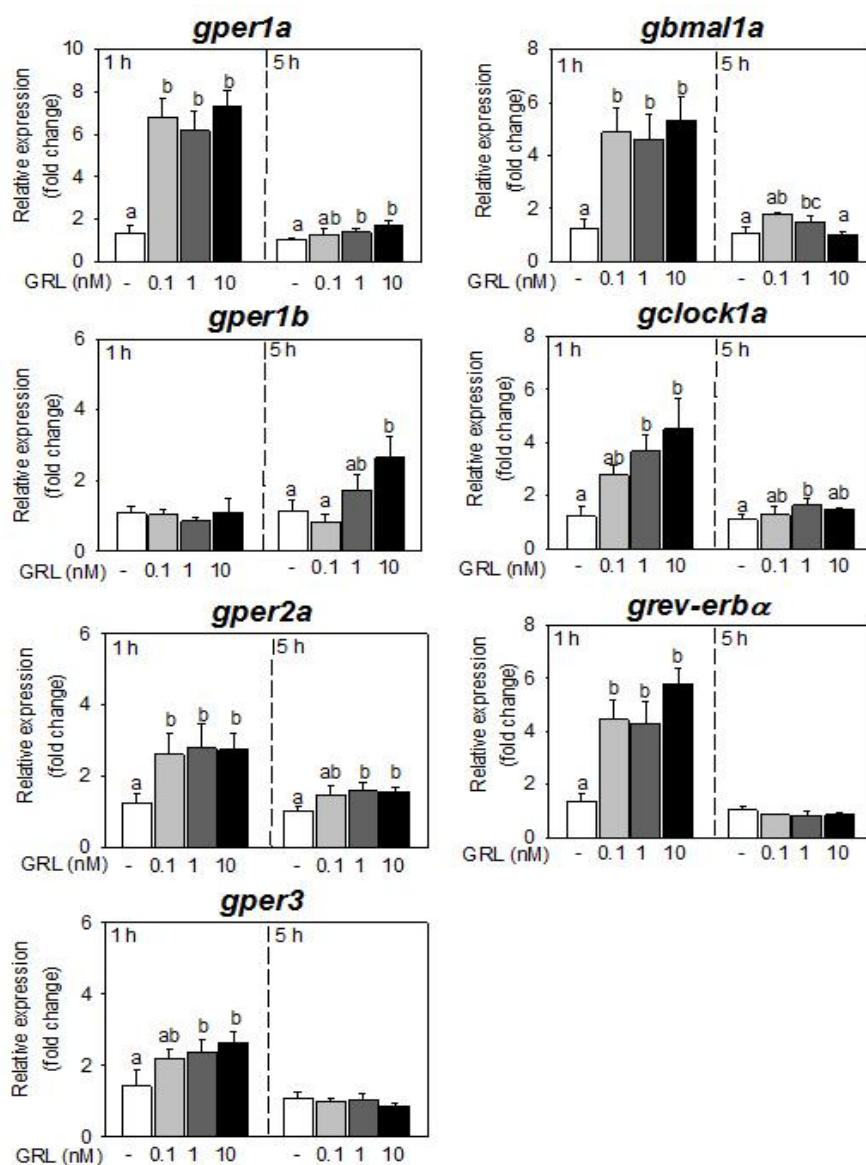
Ghrelin modifies the expression of some clock genes in goldfish liver *in vitro* (Fig. 2).

All the clock genes studied (with the exception of *gper1b*) were induced by ghrelin from 0.1 to 10 nM concentrations after 1 h of treatment (excepting *gclock1a* and *gper3* at 0.1 nM

ghrelin). The gene that showed the highest induction by ghrelin was *gper1a* with around 7-fold induction, whereas the rest of *period* genes studied, *gper2a* and *gper3*, exhibited a smaller induction (around 2-fold). Genes of the positive limb *gbmal1a*, *gclock1a* and the gene from the auxiliary loop, *grev-erba*, were induced around 4-5 fold by ghrelin. The effect was clearly declined at 5 h of exposure in all these genes. In the case of *gper3* and the gene from the auxiliary loop, *grev-erba*, the effect of ghrelin disappears completely after 5 h of treatment. The effect of ghrelin inducing the expression of *gper1b* gene expression needed 5 h of exposure to observe a 3-fold increase.

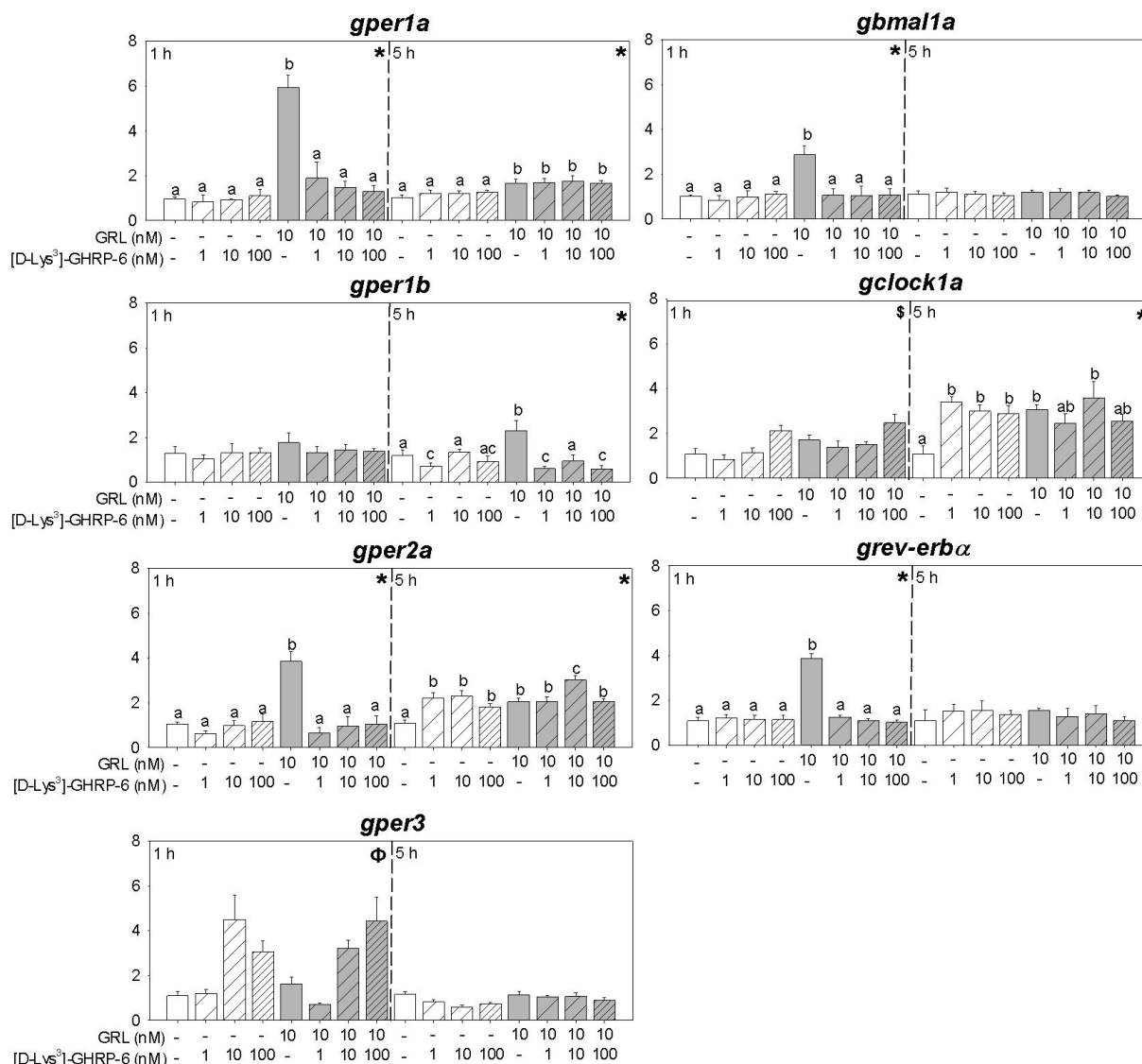
The specificity of the ghrelin evoked clock genes induction was tested by using the antagonist [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 (Fig. 3).

Preincubation with the antagonist abolished the effects of ghrelin on *gper1a*, *gper2a*, *gbmal1a* and *grev-erba* expression after 1h exposure. This blocking effect by the antagonist was observed at 5 h of incubation on *gper1b* expression but not in the rest of clock genes analysed (*gper1a*, *gper2a*, *gper3*, *bmalla* and *grev-erba*). Concerning *gclock1a* gene, [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 was not able to block the slight induction by ghrelin during both, the 1 h and 5 h treatments, because a significant gene induction is observed with the antagonist alone after 5 h exposure. The ghrelin receptor antagonist by itself also increased *gper3* expression in a concentration manner (reaching the maximal response at 10 nM) after 1 h of treatment, but not at 5-h exposure (Fig. 3).



**Figure 2.** Concentration-response curves of relative expression of clock genes in cultured liver treated with ghrelin (GRL) during 1 or 5 h. Culture medium were supplemented with different concentrations of ghrelin-17 (0, 0.1, 1, and 10 nM). Data obtained by RT-qPCR are shown as the mean  $\pm$  s.e.m. (n=6, liver aliquots from 6 different fish) in relative units ( $\Delta\Delta C_t$  method). Differences among groups (SNK test) are indicated by different letters when significant (one-way ANOVA  $p < 0.05$ ).





**Figure 3. Relative expression of clock genes in goldfish cultured liver treated with ghrelin and the antagonist of ghrelin receptor, [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6. A.** Cultured liver treated during 1 h. **B.** Cultured liver treated during 5 h. The antagonist (1, 10 or 100 nM) was added 15 min before the addition of ghrelin-17 (10 nM). Data obtained by qRT-PCR are shown as the mean  $\pm$  s.e.m. (n=6, liver aliquots from 6 different fish) in relative units ( $\Delta\Delta C_t$  method). Asterisk indicates significant antagonism of [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 on ghrelin stimulation (interaction  $p < 0.05$ ; two-way ANOVA). Small letters (a, b, c) indicate differences among ghrelin and [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 groups (SNK test). When two-way ANOVA was significant ( $p < 0.05$ ), but there was no significant interaction between factors, \$ indicates significant effect of ghrelin (*gclock1a*) respect to its control and  $\phi$  indicates significant effect of 10 and 100 nM [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 respect to 0 and 1 nM groups (*per3*).

### Involvement of the PLC-PKC pathway in the ghrelin modulation of clock gene expression

The preincubation (15 min) with the PLC inhibitor (U73122) completely abolished the induction of clock genes by ghrelin at 1 h treatment for *gper1a*, *gper1b*, *gper2a*, *gbm1a* and *grev-erba* expression (Fig. 4). In the case of *gclock1a* and *gper3*, the direct stimulatory effect of U73122 observed after 1 h of treatment hampered the observation of blocking effects of PLC inhibitor on ghrelin-evoked gene

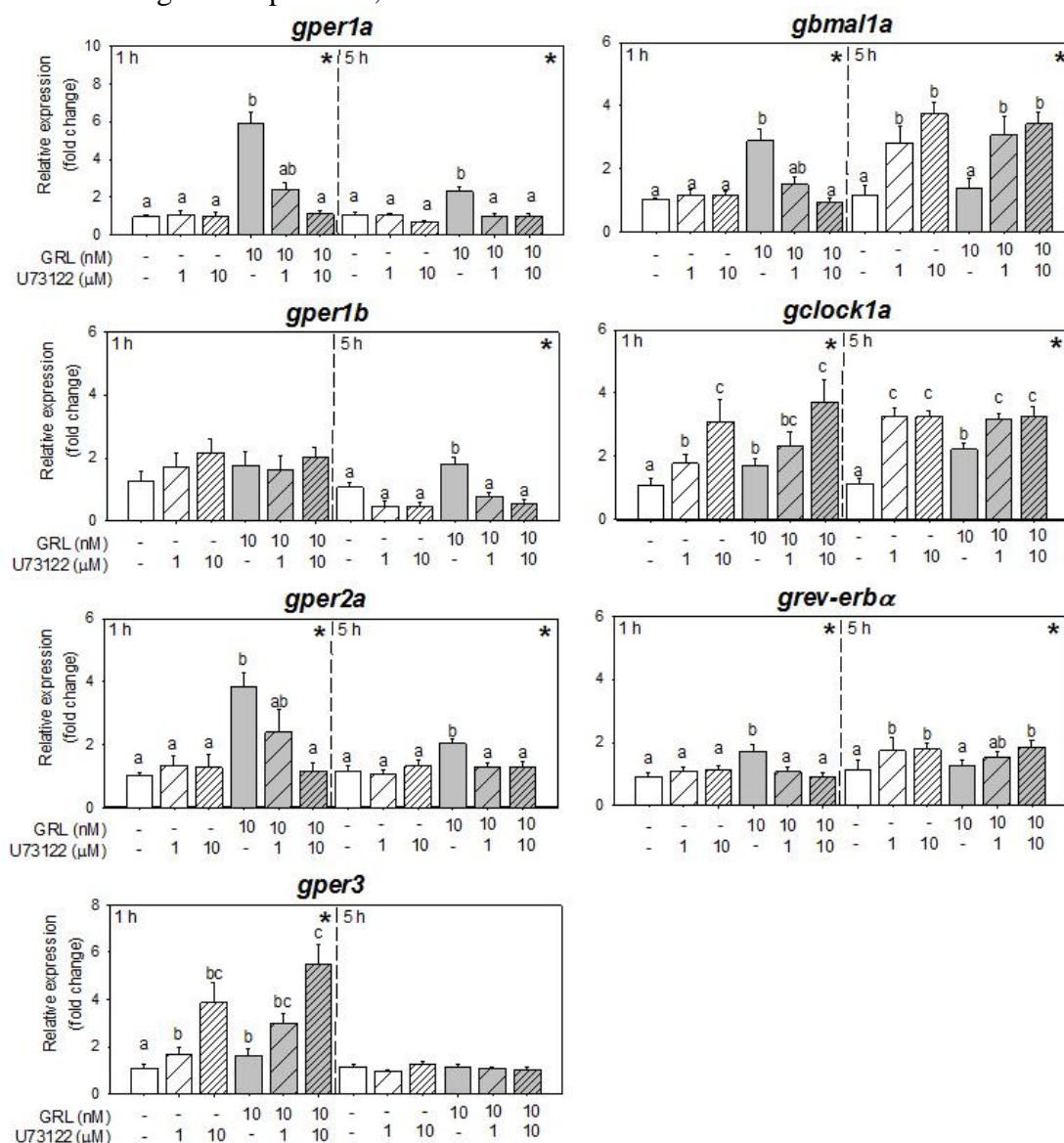
expression. Ghrelin effect in longer exposures (5h) was blocked by the U73122 only for *gper1a*, *gper1b* and *gper2a*, and the inhibitor itself showed a slight induction of *gbm1a*, *gclock1a* and *grev-erba*. The basal expression of the rest of genes analyzed was not affected by U73122 at 1 and 10  $\mu$ M concentration.

The possible role of PKC in the regulation of clock genes by ghrelin was assessed by the use of a specific inhibitor of the kinase, the CHEL (Fig. 5). The induction of clock genes

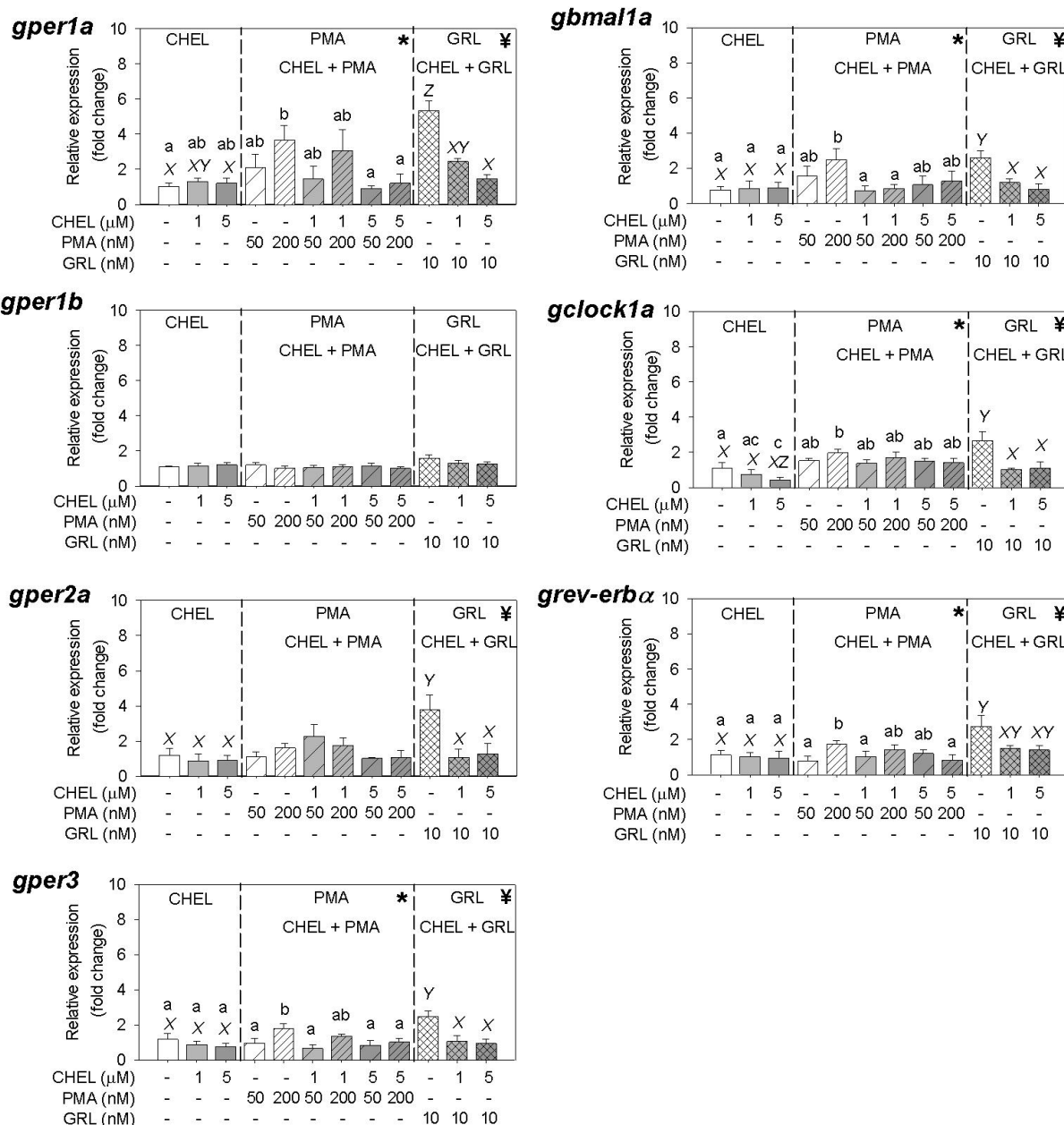
expression by ghrelin was completely blocked by the pretreatment of the liver cultures with CHEL in the majority of the studied genes (*gper1a*, *gper2a*, *gper3*, *gbmal1a* and *gclock1a*) with the exception of *grev-erbα*, which was only partially blocked. This inhibitor at 1 and 5 μM concentrations had minor effects on basal clock genes expression except a small increment that was only observed in *gper1a* expression and a slight reduction of *gclock1a* transcripts (Fig. 5).

Finally, as a positive control of the involvement of PKC on clock genes expression, liver tissue

where treated for 1 h with a direct PKC activator, the PMA (Fig. 5). This activator at low concentration (50 nM) had slight effect but a higher concentration (200 nM) induced significantly *gper1a*, *gper3*, *gbmal1a*, *gclock1a* and *grev-erbα* expression (Fig. 5). The pretreatment with CHEL (5 μM) diminished the PMA-evoked induction of *gper1a*, *gper3*, *gbmal1a*, and *grev-erbα*. Neither ghrelin nor PMA modify *gper1b* expression after 1 h of treatment.



**Figure 4. Relative expression of clock genes in cultured liver treated with ghrelin and the PLC inhibitor, U73122.** A. Cultured liver treated during 1 h. B. Cultured liver treated during 5 h. Groups with U73122 (1 or 10 μM) were preincubated during 15 min before de addition of ghrelin-17 (10 nM). Data obtained by RT-qPCR are shown as the mean ± s.e.m. (n=6, liver aliquots from 6 different fish) in relative units (ΔΔCt method). Asterisk indicates significant inhibition by U73122 of ghrelin stimulation (interaction p<0.05; two-way ANOVA). Small letters (a, b, c) indicate differences among ghrelin and U73122 groups (SNK test).



**Figure 5. Relative expression of clock genes of cultured liver treated with ghrelin, the PKC activator, PMA, and the PKC inhibitor, CHEL, during 1 h.** Groups with CHEL (1 or 5 μM) were preincubated during 15 min before de addition of PMA (50 or 200 nM) or ghrelin (10 nM). Data obtained by RT-qPCR are shown as the mean ± s.e.m. (n=6, liver aliquots from 6 different fish) in relative units ( $\Delta\Delta C_t$  method). Asterisk indicates significant inhibition by CHEL of PMA stimulation (interaction  $p < 0.05$ ; two-way ANOVA). Small letters (a, b, c) indicate differences among PMA and CHEL groups (SNK test). Symbol ¥ indicates significant inhibition by CHEL of ghrelin stimulation (interaction  $p < 0.05$ ; two-way ANOVA). Capital letters (X, Y, Z) indicate differences among ghrelin and CHEL groups (SNK test).

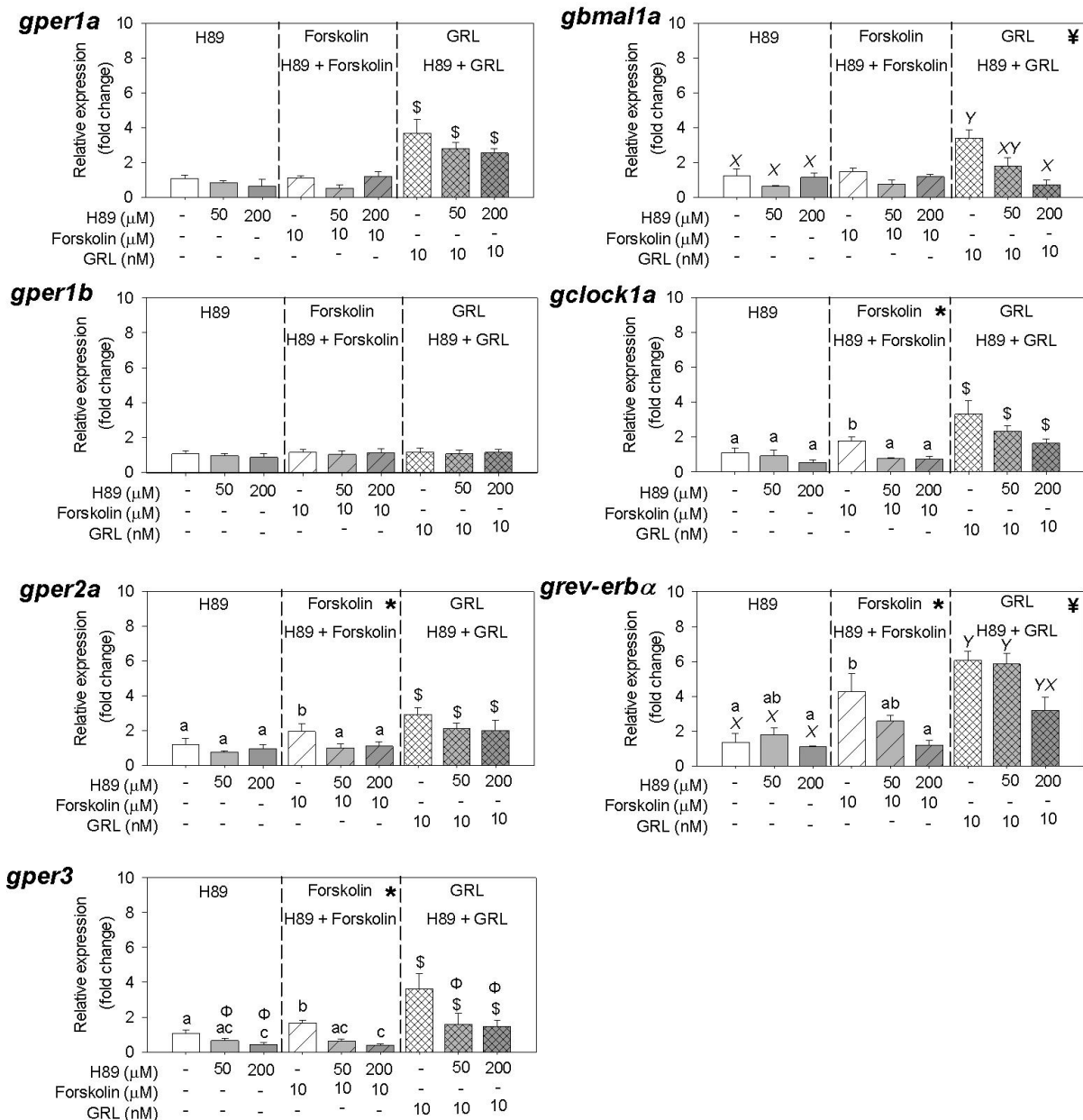
### The AC-PKA pathway in the ghrelin modulation of clock gene expression

Forskolin, an AC activator, induced the expression of *gper2a*, *gper3*, *gclock1a* and *grev-erba* while it had no effect on the rest of the clock genes analyzed after 1 h of treatment (Fig. 6). A pre-treatment with the PKA inhibitor H89, abolished such forskolin effect in all the cases.

This inhibitor by itself (in a concentration of 200 μM) decreased *gper3* expression.

Ghrelin effect on *gbm1a* and *grev-erba* expression was partially blocked by a pretreatment with H89 (significant interaction in two-way ANOVA) but this PKA inhibitor did not blocked *gper1a* and *gper2a* ghrelin induction.





**Figure 6. Relative expression of clock genes in cultured liver treated with ghrelin, the AC activator, forskolin, and the PKA inhibitor, H89 during 1 h.** Groups with H89 (50 or 200 μM) were preincubated during 15 min before de addition of forskolin; (10 μM) or ghrelin (10 nM). Data obtained by RT-qPCR are shown as the mean ± s.e.m. (n=6, liver aliquots from 6 different fish) in relative units ( $\Delta\Delta C_t$  method). Asterisk indicates significant inhibition by H89 of forskolin stimulation (interaction  $p < 0.05$ ; two-way ANOVA). Small letters (a, b, c) indicate differences among forskolin and H89 groups (SNK test). Symbol ¥ indicates significant inhibition by H89 of ghrelin stimulation (interaction  $p < 0.05$ ; two-way ANOVA). Capital letters (X, Y, Z) indicate differences among ghrelin and H89 groups (SNK test). When ghrelin-H89 two-way ANOVA was significant ( $p < 0.05$ ), but there was no significant interaction between factors, \$ indicates significant effect of ghrelin (*gper1a*, *gper2a*, *gclock1a*); and Φ indicates significant effect of H89 (*gper3*) respect to its controls.

## DISCUSSION

In the present work we demonstrate for the first time in teleosts the evidence of a direct effect of ghrelin on clock genes expression in the liver; moreover, we found that ghrelin-17 directly

induces the effect on clock genes expression via its own receptor located in the hepatic cells and that the intracellular signaling pathways that are involved are PLC-PKC and AC-PKA pathways. First of all, present results shows that ghrelin induce clock genes expression in cultured liver

of goldfish 1 h after the beginning of the treatment with the exception of *gper1b* that needed more time to be induced by this hormone (5 h). Moreover, we observed that this ghrelin effect on clock genes expression is quick and acute as it finished 5 h after the beginning of the treatment (except for *gper1b*). This is in accordance with a previous *in vivo* study carried out in goldfish, where an acute intraperitoneal injection of ghrelin-19 induces *per* genes in the liver 1 h after the injection, effect that disappears 3 h later (Nisembaum et al., 2014b). The delay observed in *gper1b* responsiveness to ghrelin signal could be due to a different sensitivity of this gene to ghrelin compared with the other *per* genes present in the liver of goldfish.

Moreover, in the previous study on goldfish (Nisembaum et al., 2014b), the pretreatment of the animals with the ghrelin receptor antagonist [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 partially blocked the ghrelin effect on hepatic clock genes in agreement with the results found in cultured liver in this our results, indicating the involvement of a ghrelin specific receptor in the observed action of ghrelin as modulator of clock genes expression. Moreover, we have found for the first time in vertebrates a wide distribution of the ghrelin receptor *ghs-r1a* in the majority of the hepatic cells, shown by an imaging technique that agrees with the previously reported ghrelin receptor presence in teleosts by PCR analysis, including goldfish (Cai et al., 2015; Kaiya et al., 2010).

The ghrelin receptor subtype GHS-R1a, whose expression has been found by *in situ* hybridization in the hepatocytes of goldfish in this study, is classically linked to the PLC-PKC intracellular transduction pathway (Chen et al., 2009; Grey and Chang, 2011; Yin et al., 2014). This circuitry that includes the activation of PLC and the transduction of the signal to the regulation of different transcriptional factors has been previously found to be determinant in the modulation of the circadian system in mammals being responsible to induce phase shifts in hamsters (Schak and Harrington, 1999), to mediate light signaling (Bonsall and Lall, 2013; Lee et al., 2007) and melatonin and NPY role on phase advance in rodents (Biello et al., 1997;

McArthur et al., 1997) and to participate in food entrainment (Zhang et al., 2012). In this sense, we have found that an activation of the PLC-PKC pathway with the PKC activator CHEL in cultured liver of goldfish induced the expression of clock genes. Going further, present results showed that ghrelin induction of clock genes is transduced via this intracellular pathway as it is completely blocked in all the cases when cultured liver were pretreated with PLC or PKC inhibitors, indicating the relationship among the presence of ghrelin, the activation of ghrelin receptors in the hepatocytes and the transduction of the signal via PLC-PKC pathway to finally induce clock genes expression. In fact, there is a certain correlation among clock genes respect to its responsiveness to PMA and ghrelin, as we have found a high induction of *gper1a*, intermediate sensitivity for *gper2a*, *gper3*, *gbmalla* and *gclock1a*, and a total insensitivity for *gper1b* after 1 h of treatment with any of them, PMA or ghrelin. Indeed, based on the results of present work, it seems that PKC pathway is the main pathway involved in the ghrelin-evoked response of all the clock genes analyzed.

However, this is not the only intracellular pathway related to the action of ghrelin receptor GHS-R1a in mammals. In this line, Gs-AC-PKA pathway has been also proposed as one of the possible intracellular transduction signals that could modulate ghrelin actions in these vertebrates (Kohno et al., 2003). This intracellular pathway has been also linked to the molecular functioning of the clock as far as the levels of cAMP are stabilizers and modulators of *per* gene transcripts levels in the fruit fly (*Drosophila melanogaster* Meigen 1830) and mammals (Hastings et al., 2014; Li et al., 2014; Motzkus et al., 2000; Zmrzljak et al., 2013) and the inhibition of PKA delays the mammalian clock (Lee et al., 1999), this enzyme induce *Per1* in human (Motzkus et al., 2007), and adjust their clock in the presence of light pulses (Tischkau et al., 2000). In this sense, present results showed that the direct activation of the AC-PKA pathway by forskolin in cultured liver implies a slight induction of some clock genes (*gper2a*, *gper3* and *gclock1a*) and in the case of *grev-erba* gene expression, it is highly

dependent on this signaling pathway (4-fold increase). This forskolin effect is reverted when liver were pretreated with H89. When the possible connection between ghrelin induction of hepatic clock genes and the transduction via AC-PKA was analyzed, present results showed that in the majority of the cases, ghrelin effect is independent of the AC-PKA intracellular pathway, with the exception of *gbmalla* and *grev-erbα*. As we observed for PKC, there is a certain correlation attending to the sensitivity of gene expression to forskolin and the potency of H89 blocking ghrelin-evoked stimulation. This parallelism is clearer for *gbmalla* and *grev-erbα*, however *gclock1a* showed H89 sensitivity although is not significant. Nonetheless, it is important to consider that the AC-PKA pathway relationship with the circadian system has been demonstrated to be almost in all the cases related to the light-dark cycle signaling transduction by CRE elements (Ginty et al., 1993; Motzkus et al., 2007; Travnickova-Bendova et al., 2002) that is more relevant in the known as light entrainable oscillators (LEOs). Ghrelin, as a food intake and energy balance signal could be more related to the food entrainable oscillators (FEOs) and this could be the explanation of the less importance of AC-PKA intracellular pathway in the transduction of this hormone signal to the clockwork.

The molecular form of ghrelin used in the present study, ghrelin-17, was previously demonstrated to be a biologically active ghrelin isoform, and the one involved in the regulation of food intake as an endogenous orexigenic factor in goldfish (Kang et al., 2011; Miura et al., 2009). Moreover, the ghrelin concentration range used in this study (0.1-10 nM) has been previously reported as physiologically significant in goldfish cultured pituitary where different isoforms of ghrelin, ghrelin-12 and ghrelin-19, induced LH and GH release (Grey and Chang, 2013; Unniappan and Peter, 2004). Moreover, the fact that both ghrelin-19 (isoform used *in vivo* by Nisembaum et al., 2014b) and ghrelin-17 (isoform used in these experiments) modulates clock genes expression in liver emphasized the importance of this peptide as an input to clock genes functioning in the hepatic oscillator. In addition, the rapidity and acutely

characteristics of the effect of ghrelin on the induction of clock genes expression is one property that is essential for synchronizing agents as we propose for the case of ghrelin and liver oscillator.

Taking into account the relevance of the liver as a link between the circadian system and metabolism and the fact that the same hormone acts at the same time as an indicator of the energetic state of the organism and as modulator of the hepatic oscillator, this could be indicating a link between the regulation of energy balance and the regulation of circadian system in teleosts. In fact, considering that under physiological conditions, high levels of circulating ghrelin, probably mimicking starvation, modify clock genes expression in hepatic oscillator in an acute but strong manner it could be propose that this hormone could act as a signal able to reset the hepatic metabolism via modulation the hepatic oscillator. In this sense, it is noteworthy that most of the genes that show circadian oscillations in liver are related to metabolic processes (Oishi et al., 2005; Reddy et al., 2007). Then, it makes sense that a crosstalking between nutritional reserves signals as ghrelin and the circadian system might be taking place in order to maintain metabolic balance for the liver, and even, for the whole organism.

In conclusion, present results demonstrate for the first time in a group of vertebrate the direct effect of ghrelin modulating the molecular functioning of the hepatic oscillator by inducing the expression of some clock genes expression via the PKC-PLC and to a lesser extent via AC-PKA pathways. If the acute clock genes response to ghrelin observed *in vitro* involves a physiological role of this orexigenic hormone as an endogenous input of the circadian system in goldfish remains to be elucidated.

## LIST OF SYMBOLS AND ABBREVIATIONS

AC	Adenilate ciclase
Bmal1	Brain and Muscle ARNT-Like 1
cAMP	Cyclic adenosin monophosphate
CHEL	Chelerythrine chloride
Clock	Circadian
Kaput	Locomotor Output Cycles
Cry	Cryptochrome

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole  
 DIG Digoxigenin  
 DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium  
 GHS-R Growth hormone secretagogue receptors  
 GRL Ghrelin  
 HNPP 2-hydroxy-3-naphthoic acid -2'-phenylanilide phosphate  
 NPY Neuropeptide Y  
 PBS Sodium phosphate buffer with saline  
 Per Period  
 PKA Protein kinase A  
 PKC Protein kinase C  
 PLC Phospholipase C  
 PMA Phorbol 12-myristate 13-acetate  
 SNK Student Newman Keuls  
 SSC Standard saline citrate  
 ZT *Zeitgeber* time

### COMPETING INTEREST

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.L.A.G., A.S.B. and E.I. conceived and designed the experiments. A.L.A.G., A.S.B., E.I. and M.J.D. interpreted the findings. A.M.B., A.S.B. and E.I. performed the experiments, collected and processed the samples and analyzed the data. A.L.A.G., A.M.B., A.S.B., E.I. and M.J.D. drafted and revised the manuscript.

### FUNDING

This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness project [MINECO; AGL2013-46448-C3-2-R]. ASB and AMB are predoctoral fellows from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and Ministerio de Educación y Ciencia, respectively.

### REFERENCES

Abizaid, A. and Horvath, T. L. (2012). Ghrelin and the central regulation of feeding and energy balance. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **16**, S617–626.

Albrecht, U. (2012). Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* **74**, 246–260.

Bechtold, D. A. (2008). Energy-responsive timekeeping. *J. Genet.* **87**, 447–458.

Biello, S. M., Golombek, D. A., Schak, K. M. and Harrington, M. E. (1997). Circadian phase shifts to neuropeptide Y *In vitro*: cellular communication and signal transduction. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 8468–8475.

Bodosi, B., Gardi, J., Hajdu, I., Szentirmai, E., Obal, F. and Krueger, J. M. (2004). Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287**, R1071–1079.

Bonsall, D. R. and Lall, G. S. (2013). Protein kinase C differentially regulates entrainment of the mammalian circadian clock. *Chronobiol. Int.* **30**, 460–469.

Cai, W., Yuan, X., Yuan, Y., Xie, S., Gong, Y., Su, H. and Qiao, Y. (2015). Sequence, genomic organization and expression of ghrelin receptor in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **179**, 54–61.

Chen, C.-Y., Asakawa, A., Fujimiya, M., Lee, S.-D. and Inui, A. (2009). Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol. Rev.* **61**, 430–481.

Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F. and Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* **14**, 2950–2961.

Delporte, C. (2013). Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica* **2013**, 518909.

del Pozo, A., Vera, L. M., Sánchez, J. A. and Sánchez-Vázquez, F. J. (2012). Molecular cloning, tissue distribution and daily expression of cry1 and cry2 clock genes in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **163**, 364–371.

- Dunlap, J. C.** (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271–290.
- Feliciano, A., Vivas, Y., de Pedro, N., Delgado, M. J., Velarde, E. and Isorna, E.** (2011). Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J. Biol. Rhythms* **26**, 24–33.
- Ginty, D. D., Kornhauser, J. M., Thompson, M. A., Bading, H., Mayo, K. E., Takahashi, J. S. and Greenberg, M. E.** (1993). Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* **260**, 238–241.
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S. A., Morris, D. G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A. B. and Korbonits, M.** (2002). The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 2988.
- Grey, C. L. and Chang, J. P.** (2011). Differential involvement of protein kinase C and protein kinase A in ghrelin-induced growth hormone and gonadotrophin release from goldfish (*Carassius auratus*) pituitary cells: PKC and PKA in GRLN-induced goldfish GH and LH release. *J. Neuroendocrinol.* **23**, 1273–1287.
- Grey, C. L. and Chang, J. P.** (2013). Differential modulation of ghrelin-induced GH and LH release by PACAP and dopamine in goldfish pituitary cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* **191**, 215–224.
- Hastings, M., O'Neill, J. S. and Maywood, E. S.** (2007). Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J. Endocrinol.* **195**, 187–198.
- Hastings, M. H., Brancaccio, M. and Maywood, E. S.** (2014). Circadian pacemaking in cells and circuits of the suprachiasmatic nucleus. *J. Neuroendocrinol.* **26**, 2–10.
- Kaiya, H., Miura, T., Matsuda, K., Miyazato, M. and Kangawa, K.** (2010). Two functional growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) type 1a and 2a in goldfish, *Carassius auratus*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **327**, 25–39.
- Kaiya, H., Kangawa, K. and Miyazato, M.** (2013). Ghrelin receptors in non-mammalian vertebrates. *Front. Endocrinol.* **4**.
- Kang, K. S., Yahashi, S., Matsuda, K., Kang, K. S., Yahashi, S. and Matsuda, K.** (2011). The effects of ghrelin on energy balance and psychomotor activity in a goldfish model: an overview. *Int. J. Pept. Int. J. Pept.* **2011**, 2011, e171034.
- Kohno, D., Gao, H.-Z., Muroya, S., Kikuyama, S. and Yada, T.** (2003). Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca<sup>2+</sup> signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* **52**, 948–956.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. and Kangawa, K.** (1999a). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656–660.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. and Kangawa, K.** (1999b). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656–660.
- Lee, J. M., Schak, K. M. and Harrington, M. E.** (1999). Inhibition of protein kinase A phase delays the mammalian circadian clock. *Brain Res.* **835**, 350–353.
- Lee, B., Almad, A., Butcher, G. Q. and Obrietan, K.** (2007). Protein kinase C modulates the phase-delaying effects of light in the mammalian circadian clock. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 451–462.
- LeSauter, J., Hoque, N., Weintraub, M., Pfaff, D. W. and Silver, R.** (2009). Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13582–13587.
- Li, Y., Guo, F., Shen, J. and Rosbash, M.** (2014). PDF and cAMP enhance PER stability in *Drosophila* clock neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E1284–1290.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* **25**, 402–408.
- López-Olmeda, J. F., Tartaglione, E. V., de la Iglesia, H. O. and Sánchez-Vázquez, F. J.** (2010). Feeding entrainment of food-anticipatory activity and *perl* expression in the brain and liver of

zebrafish under different lighting and feeding conditions. *Chronobiol. Int.* **27**, 1380–1400.

**Madrid, J. A., Boujard, T. and Sánchez-Vázquez, F. J.** (2001). Feeding Rhythms. In *Food Intake in Fish* (ed. Houlihan, D.), Boujard, T.), and Jobling, Icolm), pp. 189–215. Blackwell Science Ltd.

**Martín-Robles, A. J., Isorna, E., Whitmore, D., Muñoz-Cueto, J. A. and Pendón, C.** (2011). The clock gene *Period3* in the nocturnal flatfish *Solea senegalensis*: Molecular cloning, tissue expression and daily rhythms in central areas. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **159**, 7–15.

**McArthur, A. J., Hunt, A. E. and Gillette, M. U.** (1997). Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* **138**, 627–634.

**Mistlberger, R. E.** (2011). Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol. Behav.* **104**, 535–545.

**Miura, T., Maruyama, K., Kaiya, H., Miyazato, M., Kangawa, K., Uchiyama, M., Shioda, S. and Matsuda, K.** (2009). Purification and properties of ghrelin from the intestine of the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides* **30**, 758–765.

**Motzkus, D., Maronde, E., Grunenberg, U., Lee, C. C., Forssmann, W. and Albrecht, U.** (2000). The human *PER1* gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathways. *FEBS Lett.* **486**, 315–319.

**Motzkus, D., Loumi, S., Cadenas, C., Vinson, C., Forssmann, W.-G. and Maronde, E.** (2007). Activation of human *period-1* by PKA or CLOCK/BMAL1 is conferred by separate signal transduction pathways. *Chronobiol. Int.* **24**, 783–792.

**Nader, N., Chrousos, G. P. and Kino, T.** (2010). Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 277–286.

**Nisembaum, L. G., de Pedro, N., Delgado, M. J., Sánchez-Bretaña, A. and Isorna, E.** (2014a). Orexin as an input of circadian system in goldfish: Effects on clock gene expression and locomotor activity rhythms. *Peptides* **52**, 29–37.

**Nisembaum, L. G., de Pedro, N., Delgado, M. J. and Isorna, E.** (2014b). Crosstalk between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* **205**, 287–295.

**Oishi, K., Amagai, N., Shirai, H., Kadota, K., Ohkura, N. and Ishida, N.** (2005). Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* **12**, 191–202.

**Panda, S., Hogenesch, J. B. and Kay, S. A.** (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature* **417**, 329–335.

**Patton, D. F., Katsuyama, Â. M., Pavlovski, I., Michalik, M., Patterson, Z., Parfyonov, M., Smit, A. N., Marchant, E. G., Chung, J., Abizaid, A., et al.** (2014). Circadian mechanisms of food anticipatory rhythms in rats fed once or twice daily: clock gene and endocrine correlates. *PLoS ONE* **9**, e112451.

**Reddy, A. B., Maywood, E. S., Karp, N. A., King, V. M., Inoue, Y., Gonzalez, F. J., Lilley, K. S., Kyriacou, C. P. and Hastings, M. H.** (2007). Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology. Baltim. Md* **45**, 1478–1488.

**Sánchez-Bretaña, A., Alonso-Gómez, Á. L., Delgado, M. J. and Isorna, E.** (2015a). The liver as a component of the circadian system: integrating a network of signals. *Gen. Comp. Endocrinol.* **221**, 213–216.

**Sánchez-Bretaña, A., Blanco, A. M., Unniappan, S., Kah, O., Bertucci, J. I., Alonso-Gómez, A. L., Valenciano, A. I., Isorna, E. and Delgado, M. J.** (2015b). *In situ* localization and rhythmic expression of ghrelin and ghs-r1 ghrelin receptor in the brain and gastrointestinal tract of goldfish (*Carassius auratus*). *PLoS One*. e0141043.

**Sánchez-Bretaña, A., Gueguen, M.-M., Cano-Nicolau, J., Kah, O., Alonso-Gómez, A. L., Delgado, M. J. and Isorna, E.** (2015c). Anatomical distribution and daily profile of *gper1b* gene expression in brain and peripheral structures of goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol. Int.* **32**, 889–902.

- Sánchez-Vázquez, F. J. and Madrid, J. A.** (2001). Feeding anticipatory activity. In *Food Intake in Fish*, pp. 216–232. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Sato, T., Nakamura, Y., Shiimura, Y., Ohgusu, H., Kangawa, K. and Kojima, M.** (2012). Structure, regulation and function of ghrelin. *J. Biochem. (Tokyo)* **151**, 119–128.
- Schak, K. M. and Harrington, M. E.** (1999). Protein kinase C inhibition and activation phase advances the hamster circadian clock. *Brain Res.* **840**, 158–161.
- Schibler, U., Gotic, I., Saini, C., Gos, P., Curie, T., Emmenegger, Y., Sinturel, F., Gosselin, P., Gerber, A., Fleury-Olela, F., et al.** (2015). Clock-Talk: Interactions between central and peripheral circadian oscillators in mammals. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* DOI: 10.1101/sqb.2015.80.027490.
- Schmutz, I., Albrecht, U. and Ripperger, J. A.** (2012). The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Mol. Cell. Endocrinol.* **349**, 38–44.
- Spieler, R. E.** (1992). Feeding-entrained circadian rhythms in fishes. In *Rhythms in Fishes* (ed. Ali, M. A.), pp. 137–147. Springer US.
- Stephan, F. K.** (2002). The “other” circadian system: food as a *Zeitgeber*. *J. Biol. Rhythms* **17**, 284–292.
- Sujino, M., Furukawa, K., Koinuma, S., Fujioka, A., Nagano, M., Iigo, M. and Shigeyoshi, Y.** (2012). Differential entrainment of peripheral clocks in the rat by glucocorticoid and feeding. *Endocrinology* **153**, 2277–2286.
- Tinoco, A. B., Nisembaum, L. G., de Pedro, N., Delgado, M. J. and Isorna, E.** (2014). Leptin expression is rhythmic in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). Role of feeding time. *Gen. Comp. Endocrinol.* **204**, 239–247.
- Tischkau, S. A., Gallman, E. A., Buchanan, G. F. and Gillette, M. U.** (2000). Differential cAMP gating of glutamatergic signaling regulates long-term state changes in the suprachiasmatic circadian clock. *J. Neurosci.* **20**, 7830–7837.
- Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M. and Sassone-Corsi, P.** (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7728–7733.
- Tsang, A. H., Barclay, J. L. and Oster, H.** (2014). Interactions between endocrine and circadian systems. *J. Mol. Endocrinol.* **52**, R1–16.
- Unniappan, S. and Peter, R. E.** (2004). *In vitro* and *in vivo* effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286**, R1093–1101.
- Vera, L. M., Negrini, P., Zagatti, C., Frigato, E., Sánchez-Vázquez, F. J. and Bertolucci, C.** (2013). Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*). *Chronobiol. Int.* **30**, 649–661.
- Yannielli, P. C., Molyneux, P. C., Harrington, M. E. and Golombek, D. A.** (2007). Ghrelin effects on the circadian system of mice. *J. Neurosci.* **27**, 2890–2895.
- Yin, Y., Li, Y. and Zhang, W.** (2014). The Growth Hormone Secretagogue Receptor: Its Intracellular Signaling and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 4837–4855.
- Zhang, L., Abraham, D., Lin, S.-T., Oster, H., Eichele, G., Fu, Y.-H. and Ptáček, L. J.** (2012). PKC $\gamma$  participates in food entrainment by regulating BMAL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 20679–20684.
- Zhou, L., Gao, Q., Zhang, P., Guo, S., Gu, J., Hao, W. and Cao, J.-M.** (2014). Activation of growth hormone secretagogue receptor induces time-dependent clock phase delay in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **307**, E515–526.
- Zmrzljak, U. P., Korenčič, A., Košir, R., Goličnik, M., Sassone-Corsi, P. and Rozman, D.** (2013). Inducible cAMP early repressor regulates the *Period 1* gene of the hepatic and adrenal clocks. *J. Biol. Chem.* **288**, 10318–10327.

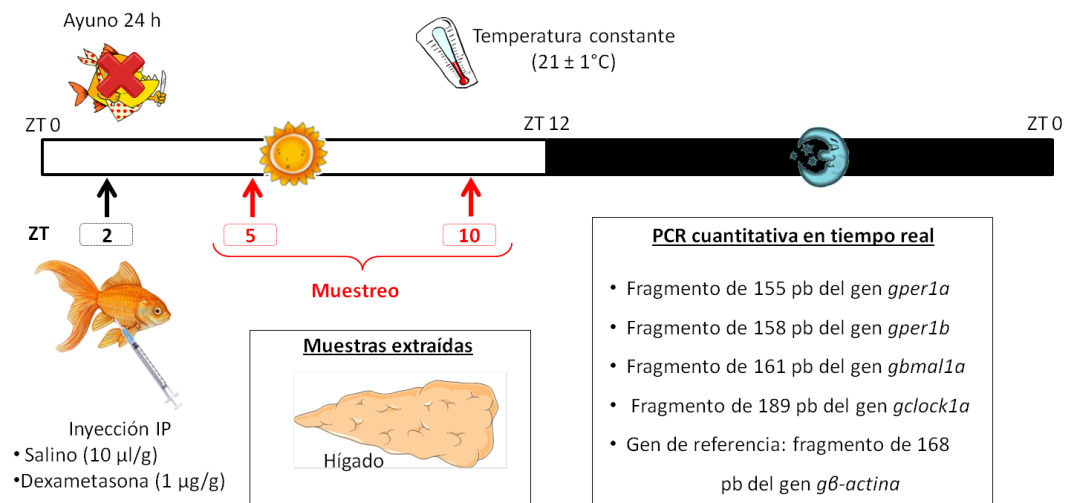
## 2.2. Glucocorticoides como reguladores de genes reloj en el hígado cultivado del carpín.

A) *Performing a hepatic timing signal: glucocorticoids induce gper1a and gper1b expression and repress gclock1a and gbmal1a in the liver of goldfish. Journal of Comparative Physiology. Part B. (2016) 186(1): 73-82*

### DISEÑOS EXPERIMENTALES

#### 1. Efecto de una inyección aguda de dexametasona sobre la expresión de genes reloj en el hígado del carpín.

Para el estudio del efecto de un aumento puntual de glucocorticoides, se realizó una inyección aguda intraperitoneal (IP) de dexametasona (1 µg/g) a ZT 2 en animales mantenidos en fotoperiodo 12L:12D y con comida una vez al día en ZT 2. El día del experimento los animales no comieron. Tras la inyección se tomaron muestras de hígado 3 y 8 h después para la medida de genes reloj mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Figura C2.7).

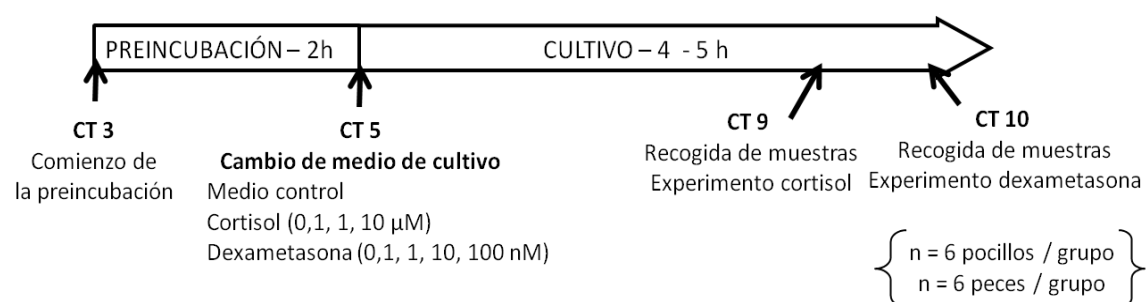


**Figura C2.7. Diseño experimental del experimento para el estudio del efecto de una inyección IP aguda de dexametasona (1 µg/g) en los genes reloj del oscilador hepático.** Los animales mantenidos en condiciones de fotoperiodo 12L:12D y alimentación a ZT 2 se inyectaron después de 24 h de ayuno en ZT2. Posteriormente se recogen muestras de hígado a las 3 y 8 h post-inyección para medir mediante PCR cuantitativa en tiempo real los genes *gper1a*, *gper1b*, *gbmal1a* y *gclock1a* y el gen de referencia *gβ-actina*.



## 2. Estudio concentración-respuesta de cortisol y dexametasona sobre los genes reloj en hígado en cultivo.

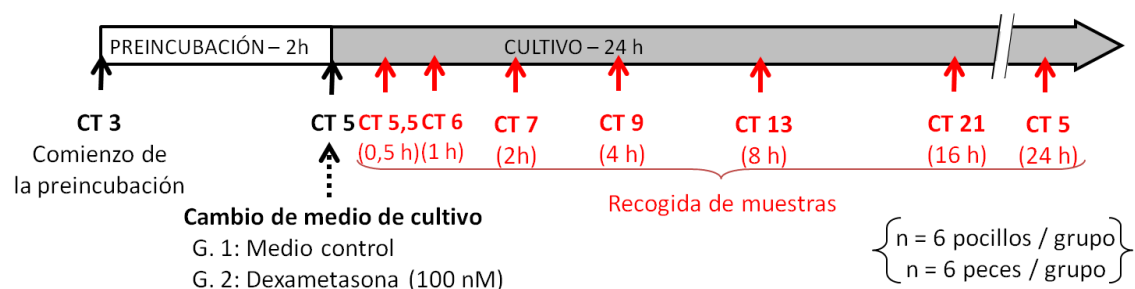
Para averiguar si los efectos sobre los genes reloj encontrados *in vivo* en el hígado del carpín en el experimento anterior se debían a una acción directa de los glucocorticoides sobre este órgano, se incubó el hígado de carpín con diferentes concentraciones del glucocorticoide endógeno en peces teleósteos, el cortisol (0, 0,1, 1 y 10  $\mu\text{M}$ ) durante 4 h o con el glucocorticoide sintético dexametasona (0,1, 1, 10 y 100 nM) durante 5 h (Figura C2.8). Como en todo los estudios *in vitro*, los animales se mantuvieron bajo condiciones de fotoperiodo 12L:12D y alimentación a ZT 2. El día del experimento, los animales se sacrificaron a ZT 2 (en ayunas) para proceder a la extracción del hígado y comenzar los cultivos. En todos los caso se dejó el tejido preincubando para su estabilización 2 horas antes de comenzar los tratamientos.



**Figura C2.8. Diseño experimental para el estudio de la curva concentración-respuesta de cortisol y dexametasona en hígados cultivados de carpín.** Los hígados se preincubaron 2 h en presencia de medio control. Posteriormente se cambió el medio por medio control o suplementado con cortisol (0,1, 1 o 10  $\mu\text{M}$ ) y se mantuvieron en estas condiciones 4 h. De modo similar en otro experimento los hígados se preincubaron 2 h en presencia de medio control. Posteriormente se cambió el medio por medio control o suplementado con dexametasona (0,1, 1, 10 o 100 nM) y se mantuvieron en estas condiciones 5 h. Se considera CT 0 el momento del encendido de las luces antes del sacrificio de los animales.

## 3. Efecto de la dexametasona sobre los genes reloj en hígado a lo largo de 24 h de cultivo.

A continuación se estudió la duración del efecto de la dexametasona mantenida en cultivo durante 24 horas. Para ello, tras las 2 h de preincubación se cambió el medio por medio control o suplementado con dexametasona (100 nM) y se mantuvieron en estas condiciones durante 24 h, recogiendo muestras a diferentes tiempos (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h; Figura C2.9).

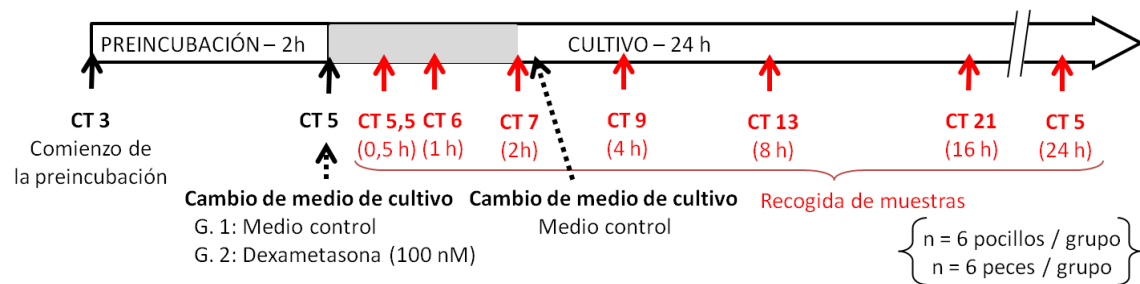


**Figura C2.9. Diseño experimental para el estudio del efecto de la dexametasona sobre los genes reloj a lo largo de 24 h en hígados cultivados de carpín.** Los hígados se preincubaron 2 h en presencia de

medio control. Posteriormente se cambió el medio por medio control o suplementado con dexametasona (100 nM) y se mantuvieron en estas condiciones 24 h, recogándose muestras a diferentes tiempos (0,5, 1, 2, 4, 8, 16 y 24 h desde el comienzo de la exposición a dexametasona). Se considera CT 0 el momento del encendido de las luces antes del sacrificio de los animales.

#### 4. Efecto de un tratamiento puntual de dexametasona sobre los genes reloj en hígado a lo largo de 24 h de cultivo.

Para estudiar el impacto que tiene un pulso de glucocorticoides (2 h) en la expresión de los genes reloj en el oscilador hepático durante las 24 h siguientes, después de la preincubación para estabilizar el tejido, se añadió dexametasona (100 nM) a uno de los grupos (G2 en la figura C2.10) o medio control (G1) y se incubó durante 2 h (fondo gris en la figura C2.10). Transcurrido este tiempo se volvió a cambiar el medio por medio control en ambos grupos experimentales y se prolongó la incubación otras 22 h recogiendo muestras durante la presencia de dexametasona (CT 5,5, CT 6 y CT 7) y hasta completar las 24 h, haciendo coincidir los puntos de muestreo con el protocolo anterior (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h; Figura C2.10).



**Figura C2.10. Diseño experimental para el estudio del impacto de un tratamiento de 2h de dexametasona (100 nM) sobre los genes reloj a lo largo de 24 h en hígados cultivados de carpín.** Los hígados se preincubaron 2 h en presencia de medio control. Posteriormente se cambió el medio por medio control (G1) o suplementado con dexametasona (100 nM, G2) y se mantuvo durante 2 h (fondo gris en la barra). Transcurrido este tiempo se cambió el medio por medio control en ambos grupos y se mantuvieron en estas condiciones 22 h más. Las muestras se recogieron en los mismos tiempos que los utilizados para el experimento previo (0,5, 1, 2, 4, 8, 16 y 24 h tras el comienzo de la exposición a dexametasona, aunque este caso a las 2 h la dexametasona se retiró del medio). Se considera CT 0 el momento del encendido de las luces antes del sacrificio de los animales.



# Performing a hepatic timing signal: glucocorticoids induce *gper1a* and *gper1b* expression and repress *gclock1a* and *gbmall1a* in the liver of goldfish

Aída Sánchez-Breña<sup>1</sup> · María Callejo<sup>1</sup> · Marta Montero<sup>1</sup> · Ángel L. Alonso-Gómez<sup>1</sup> · María J. Delgado<sup>1</sup> · Esther Isorna<sup>1</sup>

Received: 17 July 2015 / Revised: 16 September 2015 / Accepted: 22 September 2015 / Published in 2016 Jan;186(1):73-82  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

**Abstract** Glucocorticoids have been recently proposed as input signals of circadian system, although the underlying molecular mechanism remains unclear. This work investigates the role of glucocorticoids as modulators of clock genes expression in the liver of goldfish. In fish maintained under a 12L:12D photoperiod, an intraperitoneal injection at Zeitgeber Time 2 of a glucocorticoid analog, dexamethasone (1 µg/g body weight) induced *gper1* genes while decreased *gbmall1a* and *gclock1a* expression in the liver at 8 h post-injection. A 4-h in vitro exposure of goldfish liver to cortisol (0.1–10 µM) also induced *gper1* genes in a concentration-dependent manner. Similarly, the exposure of the goldfish cultured liver to dexamethasone produced a concentration-dependent induction of *gper1* genes. Moreover, this glucocorticoid analog led to a decrease in *gbmall1a* and *gclock1a* transcripts, while the other clock genes analyzed were unaffected. The induction of *gper1a* and *gper1b* by dexamethasone in vitro was observed at short times (2 h), whereas the reductions of *gbmall1a* and *gclock1a* transcripts needed longer exposure times (8 h) to the glucocorticoid to be significant. Additionally, a 2-h exposure to dexamethasone in the liver culture was enough to extend the induction of *per* genes for more than 12 h.

Present results indicate that *gper1* genes are targets for glucocorticoids in the regulation of goldfish hepatic oscillator, as previously reported in mammals, suggesting a conserved role of glucocorticoids in the functional organization of the peripheral circadian system in vertebrates. The repression of *clock1a* and *bmalla* is not so well established, and suggests that other clock genes could be glucocorticoid targets in the goldfish liver.

**Keywords** Cortisol · Dexamethasone · Liver · Circadian system · Clock genes · *per1* · Teleosts

## Abbreviations

BMAL	Brain and muscle ARNT-like 1
CLOCK	Circadian locomotor output cycles Kaput
CRY	Cryptochrome
DEX	Dexamethasone
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
GRE	Glucocorticoids response element
IP	Intraperitoneal
PER	Period
ROR	Retinoic acid related orphan receptor
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
SCN	Suprachiasmatic nucleus
SNK	Student Newman Keuls
ZT	Zeitgeber time

Communicated by G. Heldmaier.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00360-015-0936-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Esther Isorna  
eisornaa@bio.ucm.es

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, C/ José Antonio Nováis 12, 28040 Madrid, Spain

## Introduction

The circadian system controls the rhythmic physiological processes that let organisms to anticipate cyclic environmental changes. In vertebrates, these endogenous timing systems are organized by multiple coupled central and

peripheral oscillators that could be entrained by different environmental cues (Albrecht 2012; Tsang et al. 2014). Currently, it is known that the molecular basis of these oscillators is well conserved (Dunlap 1999; Panda et al. 2002). Basically, it consists on the reciprocal regulation of two interlocked transcriptional and post-translational auto-regulatory feedback loops which present an oscillation close to 24 h (Panda et al. 2002; Hastings et al. 2007). In vertebrates, the heterodimer comprising CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) and BMAL1 (Brain and Muscle ARNT-Like 1) proteins forms the positive transcriptional limb and activates the transcription of *Period* (*per*) and *Cryptochrome* (*cry*) clock genes which form the negative limb of the loop. The transcription of *per* and *cry* depends on the presence of E-box in their promoter. Once both of them are expressed, the protein heterodimer PER-CRY enters into the nucleus and inhibits CLOCK-BMAL1 transactivation (Panda et al. 2002; Hastings et al. 2007; Nader et al. 2010). This auto-regulatory loop is stabilized by an auxiliary loop formed by *Rev-erba* and *ROR* (Retinoic acid related Orphan Receptor) genes, which mainly modulates *Bmal1* expression (Guillaumond et al. 2005). This molecular mechanism involves homologous genes in all vertebrates (Panda et al. 2002; Hastings et al. 2007; Vatine et al. 2011), although a higher number of genes are present in teleost (Velarde et al. 2009; Vatine et al. 2011).

In vertebrates, including teleosts, the light-dark cycle is one of the most important external synchronizer (Reppert and Weaver 2002; Falcón et al. 2007) as well as the feeding time (Carneiro and Araujo 2009; Feliciano et al. 2011). Moreover, the circadian system is also regulated by different endogenous inputs, as metabolic signals and hormones (Mendoza et al. 2011; Nisembaum et al. 2014a, b). Glucocorticoids are one of the best studied signals that modulates mainly the peripheral oscillators in mammals (Albrecht 2012; Tsang et al. 2014; Al-Safadi et al. 2015), but this subject remains to be explored in other vertebrates.

Glucocorticoids exert numerous functions related to metabolism and stress that are mainly carried out via specific widely distributed nuclear receptors (Nikaido et al. 2010; Kalsbeek et al. 2012). Glucocorticoid plasma levels have been reported to display a strong daily rhythm in many vertebrates from fish to mammals (Nader et al. 2010; Ota et al. 2012; Kalsbeek and Fliers 2013; López-Olmeda et al. 2013). These 24-h fluctuations seem to be driven by both central and local oscillators, as the one located in the mammalian adrenal gland (Nader et al. 2010; Kalsbeek et al. 2012). This rhythmic glucocorticoid release, apart from constituting an output of the central circadian system, can also act as an input to peripheral oscillators, as suggested by the fact that glucocorticoids modify circadian gene expression in some mammalian peripheral tissues such as liver, heart, lung, stomach and kidney (Balsalobre et al. 2000; Yamamoto et al. 2005).

The liver, a main regulator of primary metabolism, is one of the most sensitive peripheral oscillators, being synchronized by glucocorticoids (among other signals) in mammals (Reddy et al. 2007; Schmutz et al. 2012; Albrecht 2012; Sujino et al. 2012). In mammalian cell lines or primary cell cultures, glucocorticoids increase *Per1* gene expression (Balsalobre et al. 2000; Fukuoka et al. 2005; Reddy et al. 2007). Furthermore, an acute treatment with the glucocorticoid analog dexamethasone (DEX) induces *Per1* gene expression in the liver of mice and rats (Yamamoto et al. 2005; Reddy et al. 2007), and produces a phase shift of clock genes expression rhythms in the mouse liver (Balsalobre et al. 2000). These effects are due, at least in part, to the presence of a GRE (Glucocorticoid Response Element) sequence in the promoter of *Per1* gene (Yamamoto et al. 2005; Reddy et al. 2007). Moreover, it has been reported that the circadian expression pattern displayed by the majority of such genes in the liver disappears in adrenalectomized rats (Oishi et al. 2005).

In teleosts, like in mammals, the circadian system is also constituted by a net of central and peripheral oscillators (Velarde et al. 2009; Feliciano et al. 2011; Vatine et al. 2011), although a hierarchic organization has not been found to date (Cahill 2002; Noche et al. 2011; Feliciano et al. 2011; Moore and Whitmore 2014). In goldfish (*Carassius auratus*), a rhythmic expression of several clock genes has been reported in the central nervous system and also in peripheral tissues (Velarde et al. 2009; Feliciano et al. 2011; Nisembaum et al. 2012; Sánchez-Bretaña et al. 2015), including the liver. Moreover, the hepatic oscillator in this teleost seems to be modulated by feeding time (Feliciano et al. 2011), and also by the orexigenic hormone ghrelin (Nisembaum et al. 2014b). In zebrafish (*Danio rerio*) larvae a relationship between glucocorticoids and peripheral clocks has been suggested by the observation that these hormones may act as permissive signals that enable the clock control of the cell cycle (Dickmeis et al. 2007).

To date, the possible role of glucocorticoids in the regulation of clock gene expression is unknown in fish. Therefore, the objective of the present study was to investigate the role of glucocorticoids as modulators of the hepatic clock gene expression in goldfish. To this aim, we first analyzed the expression of clock genes in the liver of goldfish treated with DEX in vivo. Second, we characterized the effects of glucocorticoids (cortisol and DEX) on clock gene expression in goldfish cultured liver.

## Materials and methods

### Animals and housing

Goldfish were obtained from a local supplier (Madrid, Spain) and maintained in 60-l aquaria ( $n = 9$  fish/aquarium)

with filtered and aerated water ( $22 \pm 1$  °C) under a 12L:12D photoperiod (lights on at 7:00 a.m.). Fish were daily fed at 9:00 a.m. (Zeitgeber Time, ZT 2) with a 1.5 % body weight (bw) of floating flakes (Bioflakes, Sera Pond, Heidelberg, Germany). All the fish handling procedures comply with the international standards for the Care and Use of Laboratory Animals, were approved by the Animal Experiments Committee of the Complutense University of Madrid, and were in accordance with the Guidelines of the European Union Council (2010/63/EU) for the use of research animals.

### Drugs, intraperitoneal injections and liver cultures

Stock solutions were prepared and stored at 4 °C until used. Cortisol (Sigma Aldrich, CA, USA) was prepared in absolute ethanol at 25 mM concentration. Dexamethasone (Sigma Aldrich, CA, USA) was prepared in distilled water at a concentration of 100 µM. For the in vivo assays, DEX stock solution was diluted in teleost saline (1.9 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0.6 % NaCl) to obtain the final concentration (0.1 µg/µl) for the intraperitoneal (IP) injections. The injection volume was 10 µl/g bw of the corresponding solution. For liver culture assays, cortisol and DEX stock solutions were diluted in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma Aldrich, CA, USA) to reach the required final concentrations (see below).

Goldfish (8–20 g bw) were killed at ZT 2 (before feeding time), and livers were quickly sampled and distributed in sterile culture 24-well multidish plates (each well was filled with 15 mg of liver measured as 15 µl of tissue). In each experiment, a portion of the liver of each fish was employed in all the experimental groups (the number of animals is indicated in each experimental design). After sampling, liver portions were preincubated in 1 ml of DMEM (15 mg liver/ml/well) during 2 h. Then, medium was replaced by 1 ml of DMEM alone (DEX experiments) or containing ethanol (0.03 %, cortisol experiments) in control groups, and by 1 ml of DMEM plus the respective drugs in treated groups. Plates were incubated during different periods of time depending on the experiment. The cultures were performed under light conditions and at a temperature of 20 °C. These optimal conditions for the cultures were previously determined by cell viability experiments using PrestoBlue® (Invitrogen, Carlsbad, USA; data not shown). At the end of the experiments, liver samples were collected, quickly frozen in liquid nitrogen and maintained at –80 °C until clock gene expression was measured.

### Experimental designs

1. Effect of DEX on clock genes expression in vivo.  
Goldfish ( $8.5 \pm 0.5$  g bw) maintained as previously described and fasted the day of the experiment were

divided into four experimental groups ( $n = 7/\text{group}$ ) and IP-injected with saline (2 groups) or DEX (1 µg/g; 2 groups) at ZT 2. Then, fishes were killed at 3- and 8-h post-injection, and the livers were sampled and stored at –80 °C until *gper1a*, *gper1b*, *gbmalla* and *gclock1a* expression was measured by Real Time quantitative PCR (RT-qPCR).

2. Effect of cortisol on clock genes expression in vitro.  
For studying the in vitro effects of cortisol on clock genes expression, liver aliquots ( $n = 8$  aliquots/group) were incubated during 4-h with medium containing 0.03 % ethanol (control group) or supplemented with different concentrations of cortisol (0.1, 1 and 10 µM).
3. Effect of dexamethasone on clock genes expression in vitro.
  - 3.1. In a first experiment, a DEX concentration-response study was performed. Liver aliquots ( $n = 6$  aliquots/group) obtained as above described were cultured during 5-h with medium alone (control group) or supplemented with different concentrations of DEX (0.1, 1, 10 and 100 nM).
  - 3.2. In a second experiment, a time course of DEX was carried out. Liver aliquots ( $n = 8$  aliquots/group) were cultured during different time intervals (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 and 24.5 h) in either absence (control group) or presence of DEX (100 nM).
  - 3.3. In a third experiment, liver aliquots ( $n = 8$  aliquots/group) were cultured during 2-h in the presence of DEX (100 nM). Then, DEX was removed and samples were cultured in control medium. Samples were collected at the same time points than in the previous experiment (samples from 0.5, 1 and 2 h were collected during DEX exposure).

### Clock genes expression analysis

Clock genes (*gper1a*, *gper1b*, *gper2a*, *gper3a*, *gcry1a*, *gcry2a*, *gcry3*, *gbmalla*, *gclock1a* and *gclock2*) expression was measured by RT-qPCR, using *gβ-actin* as a reference gene as previously described (Nisembaum et al. 2012; Nisembaum et al. 2014a, b). Specific primers and Gene Data Bank Reference Numbers are shown in Table 1. RNA extraction (TRI® Reagent method, Sigma Chemical, Madrid, Spain), DNase treatment (Promega, Madison, USA), cDNA synthesis (Invitrogen, Carlsbad, USA) and real-time PCR reactions (iTaQ™ SYBR® Green Supermix in a CFX96™ Real-Time System, Biorad Laboratories, Hercules, USA) were carried out following manufacturer instructions with minor modifications (Nisembaum et al. 2012). Total RNA (1 µg) was retrotranscribed and PCR reactions were developed in a final volume of 10 µl (1 µl of cDNA per sample). PCR conditions were 30 s at 95 °C,



**Table 1** Accession numbers of the genes and primers sequences employed in the quantitative RT-qPCR assays

Target gene	Accession number		Primer sequences 5' → 3'	Product (pb)
<i>gper1a</i>	EF690698	Forward	CAGTGGCTCGAATGAGCACCA	155
		Reverse	TGAAGACCTGCTGTCCGTTGG	
<i>gper1b</i>	KP663726	Forward	CTCGCAGCTCCACAAACCTA	159
		Reverse	CACAACAGCTGCAGAGGAAT	
<i>gper2a</i>	EF690697	Forward	TTTGTCAATCCCCTGGAGCCGC	116
		Reverse	AAGGATTTGCCCTCAGCCACG	
<i>gper3</i>	EF690699	Forward	GGCTATGGCAGTCTGGCTAGTAA	130
		Reverse	CAGCACAAAACCGCTGCAATGTC	
<i>gcry1a</i>	EF690700	Forward	TACCGGCTGCCACCAACAAC	106
		Reverse	TTTGGCCAAGTGGGCTGAGG	
<i>gcry2a</i>	EF690701	Forward	CGCTCTCCCTGTATGGTCAAC	102
		Reverse	AAGGCAACCCGATCTGTGTGC	
<i>gcry3</i>	EF690702	Forward	GGTGAGACAGAAGCCCTGGAA	102
		Reverse	GCTTGCGAACAGTGATTGAGCG	
<i>gbmalla</i>	KF840401	Forward	ATCGATGAGTCGTTCCCGTG	161
		Reverse	AGATTCTGTTCTGTCGGAG	
<i>gclock1a</i>	KJ574204	Forward	TCCTGGATCTGCCGCAGTTCAT	189
		Reverse	CGATGGCAGCATCTCTGTGT	
<i>gclock2</i>	HM161712	Forward	ATGACACTGAGCAATCAGCTCC	172
		Reverse	CGTGGAGGATGTGTGTGATGAA	
<i>β-actin</i>	AB039726	Forward	CAGGGAGTGATGGTTGGCA	168
		Reverse	AACACGCAGCTCGTTGTAGA	

and 40 cycles consisting of 5 s at 95 °C and 30 s at 60 °C for all genes. Calibration curves were made with serial dilutions of cDNA, exhibiting efficiencies around 100 %. Specificity of amplifications was ensured by melting curves and also tested by agarose gels. The relative mRNA expression was determined by  $\Delta\Delta C_t$  method (Livak and Schmittgen 2001).

## Data analysis

Data from the experiment 1 were analyzed by a Student t test. A one-way ANOVA followed by the post-hoc Student Newman Keuls (SNK) test was performed to analyse data from experiments 2 and 3.1. Data from long lasting cultures (experiments 3.2 and 3.3) were analyzed by a two-way ANOVA followed by SNK post-hoc test (factors: treatment and time of culture) and by a Student t test (at each time point). When necessary, data were transformed to logarithmic or square root scale to normalize and to obtain homoscedasticity. A probability level of  $p < 0.05$  was considered statistically significant in all tests.

## Results

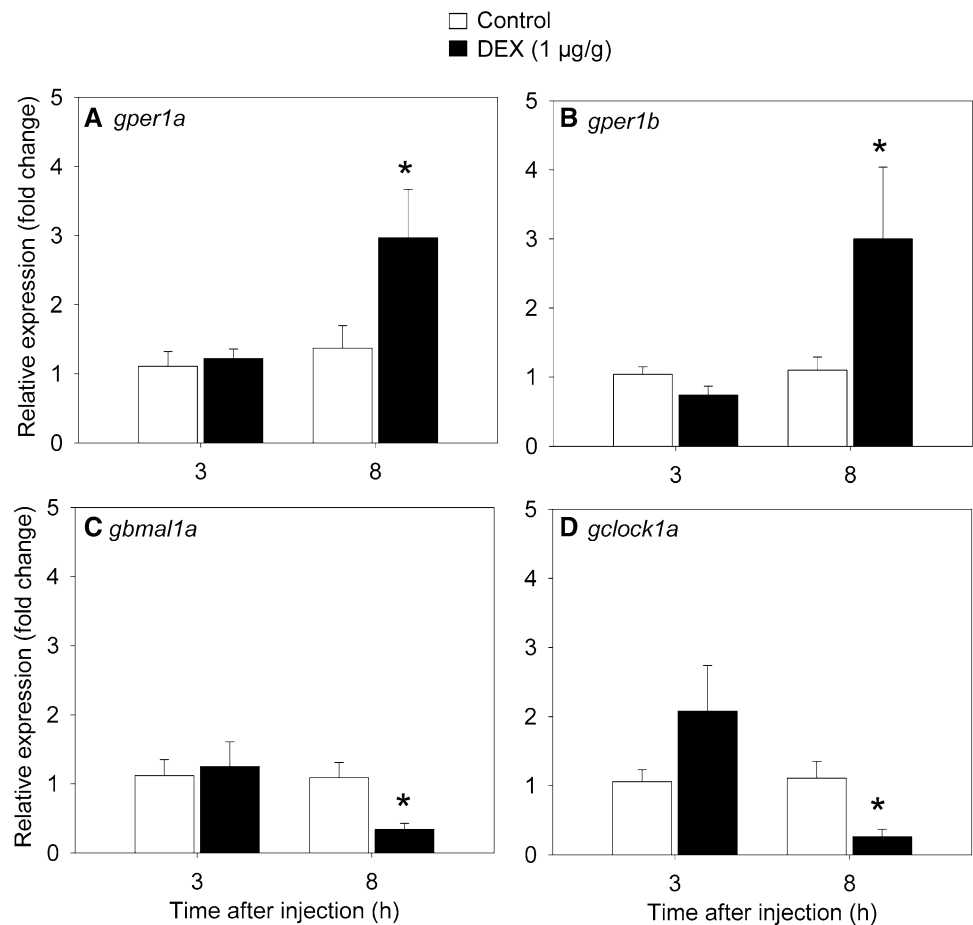
An acute injection of the glucocorticoid analog, DEX (1 µg/g) at ZT 2 significantly increased (2.5–threefold) *gper1a* and *gper1b* expression (Fig. 1a, b) and decreased

(three–fourfold) *gbmalla* and *gclock1a* expression in the liver after 8 h post-injection (Fig. 1c, d) in goldfish maintained under 12L:12D and scheduled fed at ZT 2. There was any significant effect on the expression of any of the clock genes measured 3 h after the injection (Fig. 1).

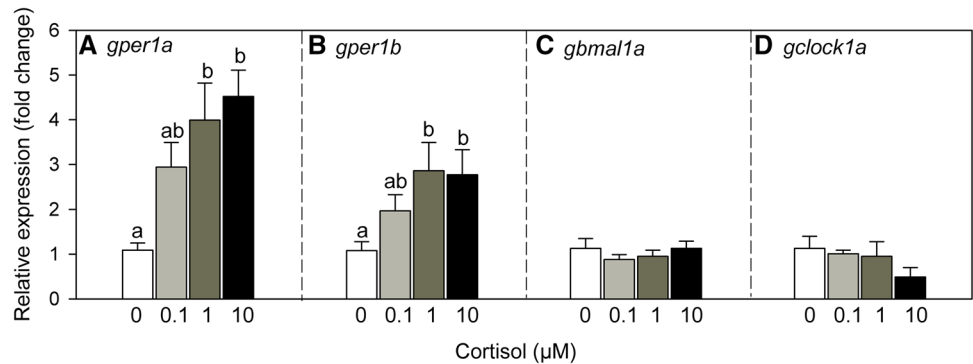
An increase of *gper1a* and *gper1b* transcripts was also induced by cortisol on in vitro liver cultures (Fig. 2a, b). This in vitro effect of cortisol was concentration-dependent. The lower concentration tested (0.1) led to a tendency in increasing clock genes expression, although not statistically significant, while the two higher concentrations increased 3–4.5 folds the relative expression of *gper1a* and *gper1b*.

The *gper1a* and *gper1b* transcripts in the liver were also upregulated by DEX after 5 h of in vitro exposure to this glucocorticoid in a concentration-dependent manner, with the strongest induction (4.5 fold) observed at the highest DEX concentration tested (100 nM) (Fig. 3a, b). The lowest concentration studied (0.1 nM) was not able to modify *gper1a* and *gper1b* expression, being 1 nM the lower concentration that induced significant increases in the expression of these clock genes. This stimulatory effect was not observed in the rest of the studied genes from the negative loop (*gper2a*, *gper3*, *gcry1a*, *gcry2a*, *gcry3* and *gclock2*, Fig. A1). However, the expression of *gbmalla*, belonging to the positive feedback loop, was concentration-dependent reduced by the corticoid, being halved in the presence of 100 nM DEX in the culture medium (Fig. 3c). No effect

**Fig. 1** Relative expression of *gper1a*, *gper1b*, *gbmal1a* and *gclock1a* in the liver of goldfish at 3- and 8-h post-injection with saline or DEX (1  $\mu$ g/g bw). White bars indicate control groups and black bars DEX-treated groups. Data obtained by RT-qPCR are shown as the mean  $\pm$  SEM. ( $n = 7$ ) in relative units ( $\Delta\Delta$ Ct method). Asterisk statistical differences between control and treated group ( $t$  student  $p < 0.05$ )



**Fig. 2** Concentration-response curves of relative expression of *gper1a* (a), *gper1b* (b), *gbmal1a* (c) and *gclock1a* (d) in goldfish cultured liver treated during 4 h with cortisol. Data obtained by RT-qPCR are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ) in relative units ( $\Delta\Delta$ Ct method). When significant (ANOVA  $p < 0.05$ ), differences among groups (SNK test) are indicated by different letters



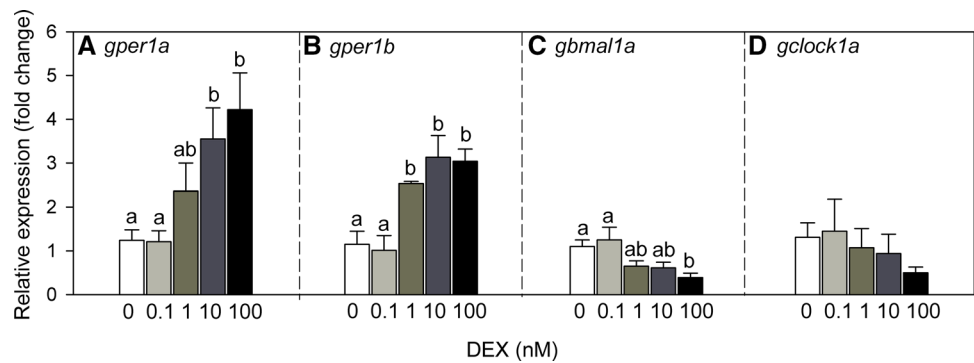
was observed when 0.1 nM DEX was applied to the culture medium, while the intermediate concentrations (1 and 10 nM) tended to reduce *gbmal1a* expression. The expression of *gclock1a* was only slightly reduced in the presence of the corticoid (Fig. 3d).

Figure 4 shows the expression profiles of the studied clock genes in liver throughout 24-h of culture time in the presence of DEX. The expression of *gper1a* and *gper1b* was significantly induced by DEX (100 nM) at different times of treatment (Fig. 4a, b). The increment of *gper1a* and *gper1b* transcripts was two–threefold and

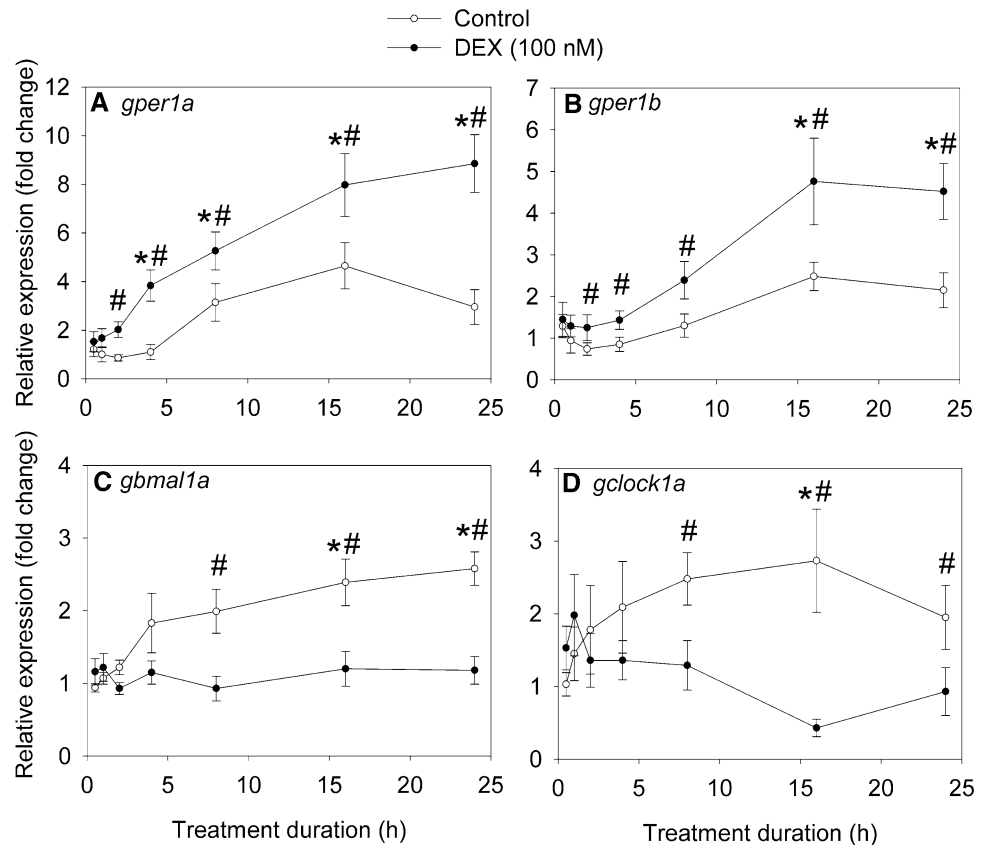
it remains when livers were exposed to DEX for up to 24 h. As expected, *gbmal1a* and *gclock1a* expression in liver was diminished by DEX (Fig. 4c, d). The expression of both genes was halved by DEX for at least 24 h when the corticoid was maintained in the culture medium. Figure 4 shows that a lag period is required for detecting the changes in clock gene expression induced by DEX. Thus, 2–4 h seems to be the lag required to observe the effects on *gper1a* and *gper1b* genes, while an approximate time of 8 h is required for the decrease of *gbmal1a* and *gclock1a* (Fig. 4).



**Fig. 3** Concentration-response curves of relative expression of *gper1a* (a), *gper1b* (b), *gbmal1a* (c) and *gclock1a* (d) in goldfish cultured liver treated during 5 h with dexamethasone. Data obtained by RT-qPCR are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ) in relative units ( $\Delta\Delta Ct$  method). When significant (ANOVA  $p < 0.05$ ), differences among groups (SNK test) are indicated by different letters



**Fig. 4** Changes in relative expression of *gper1a* (a), *gper1b* (b), *gbmal1a* (c) and *gclock1a* (d) in goldfish cultured liver treated with dexamethasone. White circles indicate control group and black circles DEX-treated group. Data obtained by RT-qPCR are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ) in relative units ( $\Delta\Delta Ct$  method). When significant (two-way ANOVA  $p < 0.05$ ), differences among groups (SNK test) are indicated by an asterisk (\*). Number sign significant differences (student  $t$  test) at each time point



The presence of DEX in the culture medium for 2 h was enough to significantly induce *gper1a* expression during at least 24 h (Fig. 5a). This exposure time to the corticoid also induced *gper1b* expression, which is reduced to control levels after 24 h (Fig. 5b). However, *gbmal1a* and *gclock1a* mRNA levels were unaffected by this short time DEX exposure (Fig. 5c, d).

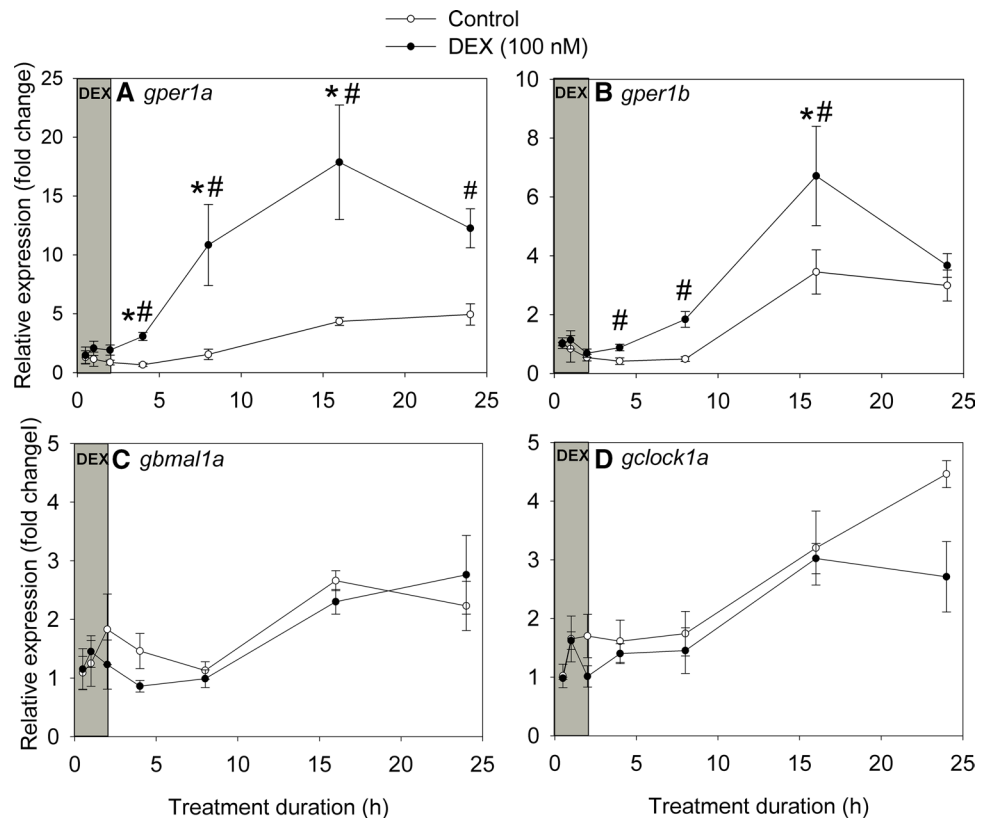
## Discussion

The results presented here show for the first time in fish that the hepatic clock is highly sensitive to glucocorticoids

inputs, which act regulating clock genes transcription (induction of negative and repression of positive elements of the transcriptional feedback loops). These findings on the negative elements is in agreement with previous reports in mammals (Balsalobre et al. 2000; Yamamoto et al. 2005; Reddy et al. 2007; So et al. 2009; Sujino et al. 2012) and suggest a conserved role of glucocorticoids in the functional organization of the liver as a key element of the peripheral circadian system in vertebrates.

Firstly, we have demonstrated the in vivo effect of DEX on the hepatic clock of goldfish, reporting for the first time in teleosts that an acute injection of this corticoid induced *gper1a* and *gper1b* expression. An upregulation of *Per1*

**Fig. 5** Changes in relative expression of *gper1a* (a), *gper1b* (b), *gbmal1a* (c) and *gclock1a* (d) in goldfish cultured liver after a 2 h-treatment with dexamethasone. White circles indicate control group and black circles, DEX-treated group. Data obtained by RT-qPCR are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ) in relative units ( $\Delta\Delta C_t$  method). Gray bars indicate the presence of DEX in the culture medium in DEX-treated groups. When significant (two-way ANOVA  $p < 0.05$ ), differences among groups (SNK test) are indicated by an asterisk (\*). Significant differences (student  $t$  test) at each time point are indicated by hash (#)



gene expression in liver has been previously reported as an effect of DEX or cortisol in adrenalectomized rats (Reddy et al. 2007; Sujino et al. 2012), and as a result of an acute injection of corticosterone or acute stress in mice (Yamamoto et al. 2005). The DEX dose used in the present study mimics stressful conditions in goldfish, thus our results confirm that glucocorticoids alter clock expression in the liver, at least at high stress levels.

Our results in vitro reveal that glucocorticoid signaling on clock genes is directly targeting the liver, and in fact glucocorticoid receptors have been reported in the liver of some teleosts (Aluru and Vijayan 2007; LaLone et al. 2012; Teles et al. 2013). In this study we have analyzed the effects of glucocorticoids not only on *per* genes that are the most studied genes related to these hormones (Balsalobre et al. 2000; Fukuoka et al. 2005; Yamamoto et al. 2005), but also on the genes from the positive loop of the molecular machinery of the clock. Cortisol, like DEX, increased the transcripts of the negative elements of the molecular clock machinery, *gper1a* and *gper1b*, at least four- and threefold, respectively, and these effects were maintained for at least 24 h in the presence of DEX, in accordance with previous in vitro studies on mammalian cells (Balsalobre et al. 2000). Besides, the DEX concentrations employed here in goldfish are similar or even lower to the ones previously reported to modify clock genes in mammals (Balsalobre et al. 2000; Xydous et al. 2012). The stimulatory

effect of DEX on *gper1* genes was even maintained when the glucocorticoid was removed from the culture medium, which can be justified by the higher (100-fold) receptor-ligand dissociation constant of DEX compared to the one for cortisol (Pratt et al. 1975). Moreover, expression of genes from the positive loop of the clock (*gbmal1a* and *gclock1a*) was decreased by DEX after their presence in the culture for at least 8 h (Fig. 4). This depressing effect is not detected in short exposures to DEX (Fig. 5). This opposite response to glucocorticoids treatments exhibited by both transcriptional loops of the liver clock is a clear evidence of their role as regulators of the molecular functioning of the hepatic oscillator in goldfish. Interestingly, this effect was concentration-dependent, indicating its specificity and physiological meaning. The lowest concentration of cortisol used in the present study (0.1  $\mu$ M,  $\sim$ 34 ng/ml) is in the range of expected physiological levels (50–80 ng/ml in non-stressed goldfish; de Pedro et al. 1997; Bernier et al. 1999), while the higher concentrations (1 and 10  $\mu$ M) could be considered as mimicking stressful conditions in goldfish, when circulating cortisol can reach levels up to 500 ng/ml (Bernier et al. 1999). Thus, present results from liver cultures support the physiological relevance of glucocorticoid effects on clock genes expression in goldfish liver not only in stressful conditions but also in non stressed fish.

The effect of DEX increasing *gper* genes expression in liver culture is observed sooner (2–4 h) than its repressing

effect on *gbmalla* and *gclock1a* expression (15 h). Moreover, when DEX was present in the culture for 2 h the expression of the genes of the positive loop was unaffected. Thus, it seems that the main target for glucocorticoids in the regulation of clock genes expression in the liver of goldfish is the *gper1* family. The existence of a GRE element in the promoter of *Per1* gene has been reported in rodents (Yamamoto et al. 2005; Reddy et al. 2007), suggesting that *Per1* might be a direct target for the glucocorticoids-mediated gene activation. From present results in goldfish liver, it would be interesting to explore the possible conservation of a homologous GRE element in the promoter of *gper1a* and *gper1b* in fish.

Glucocorticoids effects on genes of the positive limb of the molecular clock have been less studied in vertebrates, and results are not so conclusive, particularly the effect of glucocorticoids on *Bmal1* genes is somehow puzzling in the literature. On one hand, an acute treatment with corticosterone or an 1-h restraint stress does not modify *Bmal1* levels in mouse liver (Yamamoto et al. 2005). By contrast, an acute DEX treatment in SCN-ablated mice induced an increase of *Bmal1* expression in liver, where a GRE element has been found (Reddy et al. 2007). Moreover, in mammalian mesenchymal stem cells, DEX induced the oscillation of *Bmal1* gene (So et al. 2009). In the case of *Clock*, a treatment with DEX diminishes its expression in bovine lymphocytes (Nebzdoski et al. 2010).

The fact that the repression of both *gbmalla* and *gclock1a* is not observed at short-term (2-h) DEX treatment, being necessary a long-term exposure, could indicate that the effect of glucocorticoids modulating clock genes of the positive limb of the molecular clock in goldfish liver is mediated indirectly by other intermediate factors. It can be suggested that this downregulation of the positive clock genes could be a consequence of the increase of the negative elements of the clock. However, it seems that the PER-CRY dimer interacts with the CLOCK-BMAL proteins, without actions on genes expression (Panda et al. 2002; Hastings et al. 2007; Nader et al. 2010). Moreover, as 2-h DEX treatment generates increases of *per1a* and *per1b* transcripts during 24 h, but not a concomitant repression of *bmala* and *clock*, suggest that both responses are independent. Alternatively, glucocorticoids might also activate negative GRE elements in *gbmalla* and *gclock1a* genes to decrease their expression, but such presence of GRE elements in clock genes of the positive limb has not been described in any species to date. However, GREs have been reported in promoters of *ROR* and *Rev-erba* in mammals (Dickmeis et al. 2013), and it is shown that DEX represses *Rev-erba* expression in bovine lymphocytes (Nebzdoski et al. 2010). These reports let us to propose *ROR* or *Rev-erba* clock genes as possible intermediate factors for the effect of DEX on *gbmalla* and *gclock1a* clock genes.

The rest of the clock genes analyzed in goldfish cultured liver (*gper2a*, *gper3*, *gcryla*, *gcry2a*, *gcry3* and *gclock2*) remains unaffected by a 5-h exposure to DEX (Fig A1). Similarly, mice exposed to an 1-h restraint stress or treated with corticosterone showed unaffected expression of *mPer2*, *mPer3*, *mCry1*, *mCry2* and *mNpas2* (Yamamoto et al. 2005). These results might indicate a differential responsiveness of the different elements of the hepatic circadian clock to the glucocorticoids. However, this could depend on the model employed, since it has shown the presence of a GRE in *Cry1* gene in mice and humans (Reddy et al. 2007), and a synchronization of *Per2* gene by a glucocorticoid treatment (Cheon et al. 2013).

Glucocorticoids are not the only signal that regulates *Per1* gene expression. Studies in mammals have shown that *Per1* expression is modified by other signals such as insulin (Yamajuku et al. 2012), glucose (Hirota et al. 2002) or the neuropeptide Y (Fukuhara et al. 2001). Recent findings in goldfish also show that *gper1a* is induced by orexigenic peptides, including ghrelin in hypothalamus and liver (Nisembaum et al. 2014b), and orexin in the foregut (Nisembaum et al. 2014a). The demonstration that glucocorticoids are also an important signal that specifically regulates *Per1* gene in goldfish liver (present results) supports the conserved role of this *Per* family as a key target for endogenous signaling related with metabolism and food intake in vertebrates.

The physiological significance of this *Per* induction remains to be investigated, but a role in synchronization and phase shift of circadian clock genes rhythms is a good candidate, similarly to the entrainment of classical inputs. In zebrafish it is known that *per2*-light induction leads to a LD cycle synchronization (Vatine et al. 2011). Similarly, endogenous signals that increase *Per1* (e.g., glucocorticoids) could shift the phase of clock gene expression, as it is suggested in different mammalian cell lines (Balsalobre et al. 2000; So et al. 2009). In goldfish, the opposite effects of DEX increasing the negative elements and depressing the positive ones could be the basis of a possible glucocorticoid-dependent entrainment of the liver clock. Most of the genes that show circadian oscillations in liver are related to metabolic processes (Oishi et al. 2005; Reddy et al. 2007). Then, it makes sense that a cross talking between metabolic signals and the circadian system may be taking place in order to maintain optimum conditions for the liver, and even, for the whole organism functioning. Indeed, additional experiments are required to certainly demonstrate the physiological relevance of *Per1* induction by glucocorticoids.

Stress is responsible of a transient misalignment of different oscillators in mammals, where the SCN lacks glucocorticoid receptors (Akashi and Nishida 2000; Segall and Amir 2010; Al-Safadi et al. 2015) and therefore is

unresponsive to the effect of these hormones (Balsalobre et al. 2000; Al-Safadi et al. 2015). In addition, a recent report demonstrates that stress modifies *per* gene expression in a tissue-specific manner in mammals (Al-Safadi et al. 2015). Present results in a teleost evidence modifications in the hepatic oscillator by a stress-signaling hormone. Further studies will be necessary to deep into the role of stress on circadian system in this group of vertebrates.

In summary, here we show that glucocorticoids are able to modify clock genes expression in the liver of a teleost, the goldfish, mainly acting on *gper1* genes (*gper1a* and *gper1b*), as occurs in mammals, but also on other core clock genes including *gpmalla* and *gclock1a*. These results have a huge interest in the context of a non-hierarchical circadian system, as the teleostean one is considered (Cahill 2002; Noche et al. 2011), where humoral signals can be expected to play a key role in the cross talking among different clocks. Present results reinforce the goldfish as a model species to study the relationship between endocrine and circadian system in teleosts.

#### Compliance with ethical standards

**Ethical approval** All applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted. This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

**Conflict of interest** No competing interest declared.

**Funding** This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness project (MINECO; AGL2013-46448-C3-2-R). A.S-B. was funded by FPI Grant (BES-2011-047620) from MINECO.

#### References

Akashi M, Nishida E (2000) Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes Dev* 14:645–649

Albrecht U (2012) Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 74:246–260

Al-Safadi S, Branchaud M, Rutherford S, Amir S (2015) Glucocorticoids and stress-induced changes in the expression of PERIOD1 in the rat forebrain. *PLoS One* 10:e0130085

Aluru N, Vijayan MM (2007) Hepatic transcriptome response to glucocorticoid receptor activation in rainbow trout. *Physiol Genomics* 31:483–491

Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L et al (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289:2344–2347

Bernier NJ, Lin X, Peter RE (1999) Differential expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and urotensin I precursor genes, and evidence of CRF gene expression regulated by cortisol in goldfish brain. *Gen Comp Endocrinol* 116:461–477

Cahill GM (2002) Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res* 309:27–34

Carneiro BTS, Araujo JF (2009) The food-entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals? *Chronobiol Int* 26:1273–1289

Cheon S, Park N, Cho S, Kim K (2013) Glucocorticoid-mediated Period 2 induction delays the phase of circadian rhythm. *Nucl Acid Res* 41:6161–6174

De Pedro N, Alonso-Gómez AL, Gancedo B et al (1997) Effect of alpha-helical-CRF[9–41] on feeding in goldfish: involvement of cortisol and catecholamines. *Behav Neurosci* 111:398–403

Dickmeis T, Lahiri K, Nica G et al (2007) Glucocorticoids play a key role in circadian cell cycle rhythms. *PLoS Biol* 5:e78

Dickmeis T, Weger BD, Weger M (2013) The circadian clock and glucocorticoids-interactions across many time scales. *Mol Cell Endocrinol* 380:2–15

Dunlap JC (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96:271–290

Falcón J, Besseau L, Sauzet S, Boeuf G (2007) Melatonin effects on the hypothalamo–pituitary axis in fish. *Trends Endocrinol Metab* 18:81–88

Feliciano A, Vivas Y, de Pedro N et al (2011) Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J Biol Rhythms* 26:24–33

Fukuhara C, Brewer JM, Dirden JC et al (2001) Neuropeptide Y rapidly reduces Period 1 and Period 2 mRNA levels in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 314:119–122

Fukuoka Y, Burioka N, Takata M et al (2005) Glucocorticoid administration increases hPer1 mRNA levels in human peripheral blood mononuclear cells in vitro or in vivo. *J Biol Rhythms* 20:550–553

Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N (2005) Differential control of *Bmal1* circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 20:391–403

Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES (2007) Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol* 195:187–198

Hirota T, Okano T, Kokame K et al (2002) Glucose down-regulates *Per1* and *Per2* mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* 277:44244–44251

Kalsbeek A, Fliers E (2013) Daily regulation of hormone profiles. *Handb Exp Pharmacol* 217:185–226

Kalsbeek A, van der Spek R, Lei J et al (2012) Circadian rhythms in the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. *Mol Cell Endocrinol* 349:20–29

LaLone CA, Villeneuve DL, Olmstead AW et al (2012) Effects of a glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone, on fathead minnow reproduction, growth, and development. *Environ Toxicol Chem SETAC* 31:611–622

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25:402–408

López-Olmeda JF, Blanco-Vives B, Pujante IM et al (2013) Daily rhythms in the hypothalamus–pituitary–interrenal axis and acute stress responses in a teleost flatfish, *Solea senegalensis*. *Chronobiol Int* 30:530–539

Mendoza J, Lopez-Lopez C, Revel FG et al (2011) Dimorphic effects of leptin on the circadian and hypocretinergic systems of mice. *J Neuroendocrinol* 23:28–38

Moore HA, Whitmore D (2014) Circadian rhythmicity and light sensitivity of the zebrafish brain. *PLoS One* 9:e86176

Nader N, Chrousos GP, Kino T (2010) Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol Metab* 21:277–286

- Nebzydoski SJ, Pozzo S, Nemec L et al (2010) The effect of dexamethasone on *clock* gene mRNA levels in bovine neutrophils and lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 138:183–192
- Nikaido Y, Aluru N, McGuire A et al (2010) Effect of cortisol on melatonin production by the pineal organ of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol* 155:84–90
- Nisembaum LG, de Pedro N, Delgado MJ et al (2014a) Orexin as an input of circadian system in goldfish: effects on clock gene expression and locomotor activity rhythms. *Peptides* 52:29–37
- Nisembaum LG, de Pedro N, Delgado MJ, Isorna E (2014b) Cross-talking between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *Gen Comp Endocrinol* 205:287–295
- Nisembaum LG, Velarde E, Tinoco AB et al (2012) Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol Int* 29:665–673
- Noche RR, Lu P-N, Goldstein-Kral L et al (2011) Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain. *BMC Neurosci* 12:7
- Oishi K, Amagai N, Shirai H et al (2005) Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res Int J Rapid Publ Rep Genes Genomes* 12:191–202
- Ota T, Fustin J-M, Yamada H et al (2012) Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 349:30–37
- Panda S, Hogenesch JB, Kay SA (2002) Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417:329–335
- Pratt WB, Kaine JL, Pratt DV (1975) The kinetics of glucocorticoid binding to the soluble specific binding protein of mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 250:4584–4591
- Reddy AB, Maywood ES, Karp NA et al (2007) Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology* 45:1478–1488
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935–941
- Sánchez-Bretaña A, Gueguen M-M, Cano-Nicolau J et al (2015) Anatomical distribution and daily profile of *gper1b* gene expression in brain and peripheral structures of goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol Int* 32:889–902
- Schmutz I, Albrecht U, Ripperger JA (2012) The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Mol Cell Endocrinol* 349:38–44
- Segall LA, Amir S (2010) Glucocorticoid regulation of clock gene expression in the mammalian limbic forebrain. *J Mol Neurosci* 42:168–175
- So AY-L, Bernal TU, Pillsbury ML et al (2009) Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:17582–17587
- Sujino M, Furukawa K, Koinuma S et al (2012) Differential entrainment of peripheral clocks in the rat by glucocorticoid and feeding. *Endocrinology* 153:2277–2286
- Teles M, Boltaña S, Reyes-López F et al (2013) Effects of chronic cortisol administration on global expression of GR and the liver transcriptome in *Sparus aurata*. *Mar Biotechnol N Y N* 15:104–114
- Tsang AH, Barclay JL, Oster H (2014) Interactions between endocrine and circadian systems. *J Mol Endocrinol* 52:R1–R16
- Vatine G, Vallone D, Gothilf Y, Foulkes NS (2011) It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett* 585:1485–1494
- Velarde E, Haque R, Iuvone PM et al (2009) Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of *period* and *cryptochrome* transcripts in retina, liver, and gut. *J Biol Rhythms* 24:104–113
- Xydous M, Sekeri-Pataryas KE, Prombona A, Sourlingas TG (2012) Nicotinamide treatment reduces the levels of histone H3K4 trimethylation in the promoter of the *mper1* circadian clock gene and blocks the ability of dexamethasone to induce the acute response. *Biochim Biophys Acta* 1819:877–884
- Yamajuku D, Inagaki T, Haruma T et al (2012) Real-time monitoring in three-dimensional hepatocytes reveals that insulin acts as a synchronizer for liver clock. *Sci Rep* 2:439
- Yamamoto T, Nakahata Y, Tanaka M et al (2005) Acute physical stress elevates mouse *period1* mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J Biol Chem* 280:42036–42043

## **ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL**

**PERforming a hepatic timing signal: glucocorticoids induce *gper1a* and *gper1b* expression and repress *gclock1a* and *gbmall1a* in the liver of goldfish**

**Journal of Comparative Physiology. Part B.**

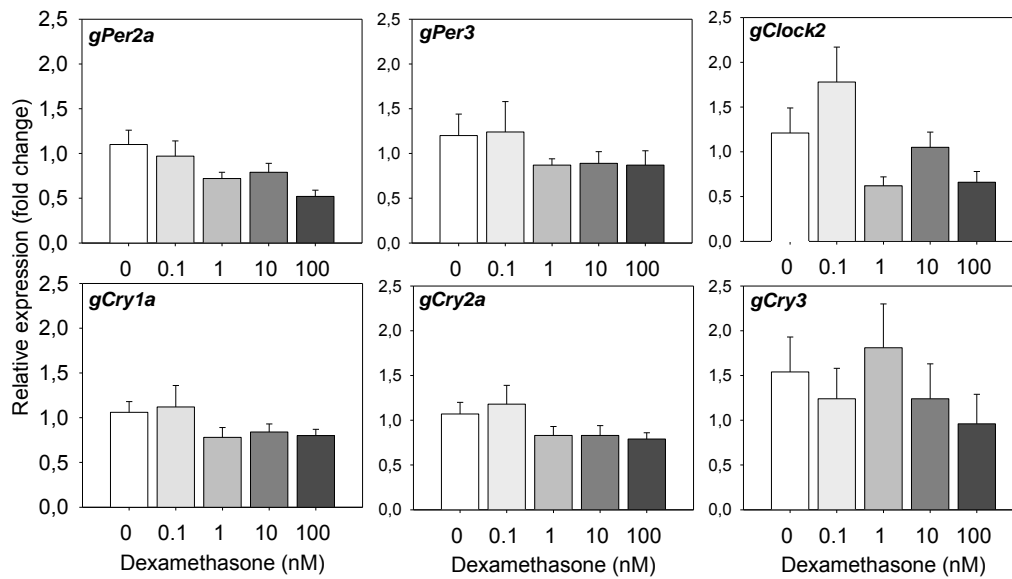
Aída Sánchez-Breñaño, María Callejo, Marta Montero, Ángel L. Alonso-Gómez, María J. Delgado, Esther Isorna\*.

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II). Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid, Spain.

\* Corresponding author's e-mail: [eisornaa@bio.ucm.es](mailto:eisornaa@bio.ucm.es)



## APPENDIX 1



**Fig. A1 Relative expression of *gper2a*, *gper3*, *gcry1a*, *gcry2a*, *gcry3* and *gclock2* in goldfish cultured liver treated during 5 h with dexamethasone.** Data obtained by qRT-PCR are shown as the mean  $\pm$  s.e.m. (n=6) in relative units ( $\Delta\Delta C_t$  method). No statistically significant differences were found by one-way ANOVA for any of these genes.





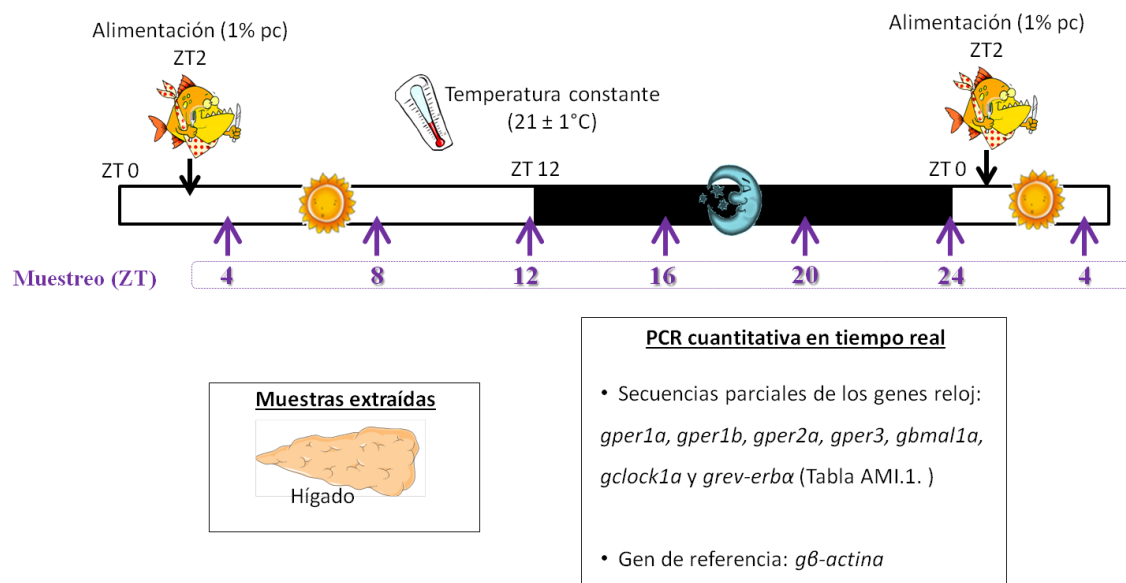
## 2.2. Glucocorticoides como reguladores de genes reloj en el hígado cultivado del carpín.

B) Clock genes expression in liver of goldfish in vivo, in vitro and synchronization by glucocorticoids. En preparación para enviar a Journal of Comparative Physiology. Part B.

### DISEÑOS EXPERIMENTALES

#### 1. Patrón diario de expresión de genes reloj en el hígado del carpín.

En primer lugar se estudió el funcionamiento del oscilador hepático (oscilaciones diarias de genes reloj) en peces mantenidos en fotoperiodo 12L: 12D y alimentados diariamente a ZT 2 durante 15 días. El día del experimento los animales fueron alimentados con normalidad y sacrificados cada 3 h durante un ciclo completo de 24 h. Se obtuvieron muestras de hígado que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta el análisis de la expresión de genes reloj (*gper1a*, *gper1b*, *gper2a*, *gper3*, *gbmal1a*, *gclock1a* y *grev-erba*) (Figura C2.11).



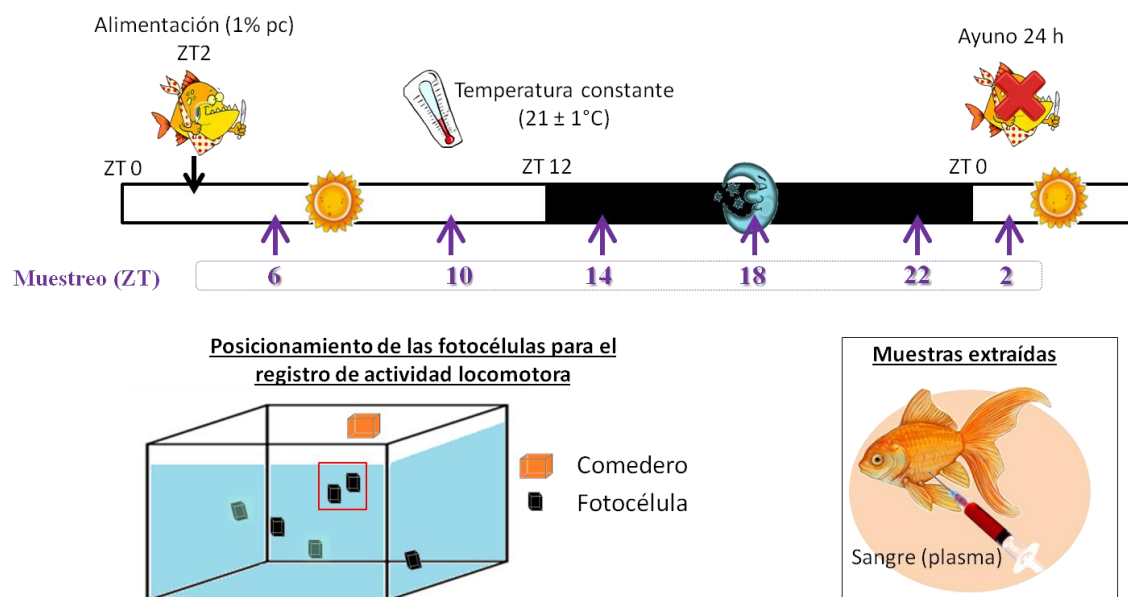
**Figura C2.11. Diseño experimental del experimento para el estudio de la expresión diaria de los genes reloj en el hígado del carpín en condiciones de 12L:12D y alimentación en ZT 2.** Se tomaron muestras de hígado cada 4 h para analizar la posible ritmicidad diaria de la expresión genes reloj mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizaron fragmentos parciales de los genes *gper1a*, *gper1b*, *gper2a*, *gper3*, *gbmal1a*, *gclock1a* y *grev-erba* y el gen de referencia *gβ-actina*. En otro experimento con animales en las mismas condiciones se extrajeron muestras de sangre a lo largo de un ciclo de 24 horas (intervalos de 4 h) de la que se obtuvo el plasma para la cuantificación de los niveles de cortisol circulante.

#### 2. Patrones diarios de actividad locomotora y de niveles plasmáticos de cortisol en el carpín.

Se determinó el patrón diario de actividad locomotora de los peces mantenidos en condiciones de 12L: 12D y alimentación a ZT 2. Para ello los animales fueron mantenidos en

grupos de 8-9 carpines por acuario en acuarios con las paredes tapadas con el fin de evitar interferencias entre unos y otros, se colocaron en las paredes células infrarrojas que emiten un haz que es cortado cada vez que un pez lo atraviesa (figura C2.12). La actividad locomotora era registrada (15 días) por las diferentes fotocélulas y recogida por un *software* que agrupaba los cortes del haz infrarrojo en intervalos de 10 minutos. Los registros obtenidos se analizaron con el software de cronobiología *El Temps*<sup>®</sup> (Prof. Díez Noriega) gracias al cual se obtuvieron la representación gráfica mostrada en el presente apartado del capítulo 2 (media de la actividad locomotora diaria en intervalos de 10 minutos a lo largo de todo el periodo registrado).

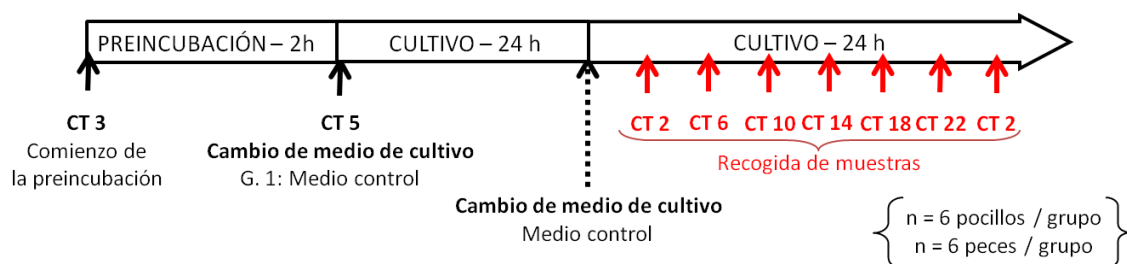
Por otro lado, el primer paso para el estudio de los glucocorticoides como posibles candidatos a ser entrada del sistema circadiano fue la comprobación de la presencia de una ritmicidad diaria en sus niveles circulantes en el carpín. Para ello, se realizó una toma de sangre de peces mantenidos en las mismas condiciones que se describieron en el apartado previo (12L: 12D y alimentación en ZT 2). Posteriormente, se separó el plasma que se almacenó a -20°C hasta que se realizó el enzoinmunoensayo de cortisol (figura C2.12).



**Figura C2.12. Diseño experimental del experimento para el estudio del patrón de actividad locomotora y de los niveles plasmáticos de cortisol en carpín en condiciones de 12L:12D y alimentación en ZT 2.** Se registró la actividad locomotora de los animales mantenidos en grupos de 8-9 carpines durante 15 días gracias a 6 fotocélulas infrarrojas situadas en diferentes alturas de los acuarios. A final de los 15 días, se extrajeron muestras de sangre a lo largo de un ciclo de 24 horas (intervalos de 4 h) de la que se obtuvo el plasma para la cuantificación de los niveles de cortisol circulante mediante un enzoinmunoensayo comercial (Demeditec).

### 3. Funcionamiento del oscilador hepático en condiciones *in vitro*. Cultivos de hígado a largo plazo.

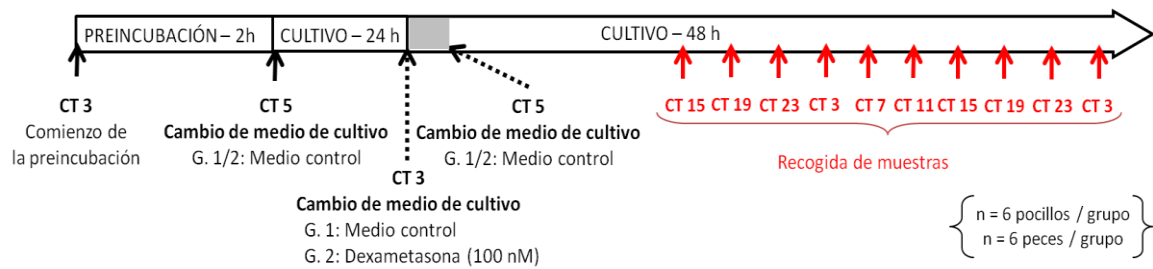
Con el fin de conocer el estado del oscilador hepático aislado del organismo, se estudió el patrón de expresión de los genes reloj a lo largo de un ciclo de 24 horas en hígado mantenido en cultivo. Para ello, como en el resto de cultivos de esta Tesis, peces mantenidos en condiciones de 12L:12D y alimentación en ZT 2 fueron sacrificados en ZT 2 tras 24 h de ayunas y se extrajeron los hígados para su cultivo. Pasadas 24 h del comienzo del cultivo, se comenzaron a recoger muestras en intervalos regulares de 4 h hasta completar un ciclo entero de 24 h (Figura C2.13).



**Figura C2.13.** Diseño experimental del experimento para el estudio de la expresión diaria de los genes reloj en el hígado cultivado de carpines mantenido en condiciones de 12L:12D y alimentación a ZT 2. Tras 24 h en cultivo, se tomaron muestras cada 4 h para analizar la posible ritmicidad diaria de la expresión genes reloj mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se cuantificó la expresión de los genes *gper1a*, *gper1b*, *gbmal1a* y *grev-erba* y el gen de referencia *gβ-actina*. Se considera CT 0 el momento del encendido de las luces antes del sacrificio de los animales.

- Resincronización por glucocorticoides *in vitro*. Estudio del efecto de una exposición aguda a dexametasona en cultivos de hígado a largo plazo.

A continuación se estudió si un pulso de dexametasona en el medio de cultivo puede ajustar el oscilador hepático a la situación que existía *in vivo* (resultado del experimento *in vivo* previamente descrito), pero que se pierden parcialmente en condiciones *in vitro* (resultados del experimento anterior). Para ello, se cultivaron explantes de hígado y se mantuvieron en cultivo durante tres días, cambiando el medio de cultivo cada 24 h (tiempo óptimo para mantener el tejido en buenas condiciones). Durante las primeras 24 h los dos grupos experimentales (G1 y G2, Figura C2.12) se mantuvieron con medio control. Tras este tiempo, se añadió dexametasona (100 nM) al medio al grupo G2 (gris en la barra) o medio control al grupo G1 y se incubó durante 2 h. Posteriormente se cambió el medio por medio control en ambos grupos. Las muestras comenzaron a recogerse 12 h después del comienzo del tratamiento con la dexametasona y se recogieron en intervalos de 4 h, como en el caso anterior, hasta completar un ciclo de 48 h (Figura C2.14).



**Figura C2.14. Diseño experimental del experimento para el estudio del efecto de una exposición aguda (2 h) a dexametasona (100 nM) en la expresión diaria de los genes reloj en el hígado cultivado de carpines mantenido en 12L:12D y alimentados a ZT 2.** Tras 24 h en cultivo, se expusieron los explantes de hígado a dexametasona (100 nM) durante 2 h, después de las cuales se cambió el medio de cultivo por medio control y 12 h después se tomaron muestras cada 4 h, durante 36 h, para analizar la posible ritmicidad diaria de la expresión genes reloj mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se cuantificó la expresión de los genes *gper1a*, *gper1b*, *gbmal1a* y *grev-erba* y el gen de referencia *gβ-actina*. Se considera CT 0 el momento del encendido de las luces antes del sacrificio de los animales.

# Clock genes expression rhythms in liver of goldfish *in vivo* and *in vitro*. Possible role of glucocorticoids as synchronizers.

Aída Sánchez-Bretaña<sup>1</sup>, Ángel L. Alonso-Gómez<sup>1</sup>, María J. Delgado<sup>1</sup>, Esther Isorna<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II). Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid, Spain.

\* Esther Isorna

e-mail: eisornaa@bio.ucm.es

## ABSTRACT

The liver is proposed as the most important link between metabolic signals and the circadian system in mammals. This oscillator is sensitive to both external and internal cyclic signalling, including light-dark and feeding-fasting cycles and hormones. Among the endogenous signals, glucocorticoids are the best known in mammals and have been reported to be synchronizers and responsible of phase shifts in the liver. Moreover, a daily pattern in the glucocorticoid plasmatic levels has been previously described in vertebrates, including some teleosts. Here we show that, in the presence of a light-dark cycle and scheduled feeding regime, goldfish hepatic clock genes are expressed rhythmically. As expected, *gbmalla* and *gclockla* are in antiphase with *per* genes and *grev-erba*. In addition, present results show that in this teleost cortisol plasmatic levels exhibit a daily pattern with the highest levels during the night, anticipating the onset of the activity phase. *In vitro*, the rhythmicity of almost all the hepatic oscillator's components disappears, with the exception of *gper1b* whose amplitude is drastically diminished

and the rhythm is strongly phase shifted. The rhythmicity of all the clock genes analysed in the liver is re-established *in vitro* with a 2-h pulse of dexamethasone at least till 36 h after the treatment, being the acrophases of *gbmalla* and *gclockla* opposite to the ones observed for *per* genes and *grev-erba*, suggesting a role of glucocorticoids as direct synchronizers of hepatic oscillator in goldfish. Present data agree with the previously reported to mammals, and suggest a conservative role of glucocorticoids in the functional organization of the peripheral circadian system in vertebrates.

## List of abbreviations:

BMAL, Brain and Muscle ARNT-Like 1; CLOCK, Circadian Locomotor Output Cycles Kaput; DEX, dexamethasone; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; PER, period; ROR, Retinoic acid related Orphan Receptor; RT-qPCR, Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction; SNK, Student Newman Keuls; ZT, *zeitgeber* time.

**Key words:** clock genes, dexamethasone, liver, circadian system, fish

## INTRODUCTION

The vertebrate circadian system is organized by multiple coupled central and peripheral oscillators that could be entrained by different environmental and endogenous cues (Albrecht 2012; Tsang et al. 2014; Schibler et al. 2015). These oscillators function through a well conserved molecular mechanism that enables them to oscillate in a rhythmic manner. Basically, it consists in the reciprocal regulation of two interlocked transcriptional and post-translational auto-regulatory feedback loops which present an oscillation close to 24 h (Hastings et al. 2007; Nader et al. 2010; Schibler et al. 2015). In vertebrates, the heterodimer comprising CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) and BMAL1 (Brain and Muscle ARNT-Like 1) proteins forms the positive transcriptional limb and activate the transcription of *Period* (*per*) and *Cryptochrome* (*cry*) clock genes which forms the negative limb. Once both of them are expressed, the dimer PER-CRY enters in the nucleus and inhibits CLOCK-BMAL1 transactivation (Hastings et al. 2007; Nader et al. 2010; Schibler et al. 2015). This auto-regulatory loop is stabilized by an auxiliary loop formed by *Rev-erba* and  $\beta$  and *ROR* (Retinoic acid related Orphan Receptor) genes, which mainly modulates *Bmal1* expression (Nader et al. 2010; Schibler et al. 2015). This molecular mechanism involves homologous genes in all vertebrates (Hastings et al. 2007; Vatine et al. 2011), although a higher number of genes are present in teleosts (Vatine et al. 2011; Sánchez-Bretaño et al. 2015a). Among the peripheral oscillators, the liver has been proposed as one of the most sensitive links between metabolic signals and the circadian system in mammals (Schmutz et al. 2012; Albrecht 2012; Eckel-Mahan and Sassone-Corsi 2013; Tsang et al. 2014; Schibler et al. 2015). This endogenous oscillator can be synchronized (in mammals and teleosts) by external signals such as light-dark cycle (Hastings et al. 2007; López-Olmeda et al. 2010; Albrecht 2012; Vera et al. 2013; Paredes et al. 2014) and restricted feeding time (Stokkan et al. 2001; Feliciano et al. 2011; Sujino et al. 2012; De Ita-Pérez et al. 2014; Adamovich et al. 2014; Pérez-Mendoza et al. 2014; Valdés-Fuentes et al. 2015).

Additionally, many internal signals have been described to have a role in modulating the liver clock (Schibler et al. 2015). One of the most studied endogenous signals able to modulate the hepatic oscillator in mammals are the glucocorticoids (Reddy et al. 2007; Schmutz et al. 2012; Albrecht 2012; Sujino et al. 2012; Schibler et al. 2015). These hormones induce *Per1* gene expression in mammalian cell cultures, and in liver, kidney, heart, lung and stomach of rodents treated with dexamethasone (Cavallari et al. 2011). These effects are due, at least in part, to the presence of a GRE (Glucocorticoid Response Element) sequence in the promoter of *Per1* gene (Yamamoto et al. 2005; Reddy et al. 2007). As synchronizers, glucocorticoids are able to produce a phase shift of clock genes expression rhythms in the liver of mice (Balsalobre et al. 2000). Recently, it has been suggested that this could be a conserved feature in vertebrates, as it has been demonstrated that in goldfish glucocorticoids (cortisol and the analog dexamethasone) also induce *perl* (*gperl1a* and *gperl1b*), at time that repress *gbmalla* and *gclock1* (Sánchez-Bretaño et al. 2016). Moreover, a role of glucocorticoids as an internal cue for peripheral oscillators in teleosts has been suggested, since a transient dexamethasone treatment is able to induce bioluminescence rhythms in *zfp1b-Luc* transfected zebrafish and cavefish cells (Cavallari et al., 2011). A role of glucocorticoids as internal synchronizers for peripheral oscillators is also supported by the robust daily rhythms of these hormones. Plasma levels of glucocorticoids have been reported to display a strong daily rhythm in many vertebrates from some fish to mammals (Nader et al. 2010; Ota et al. 2012; Kalsbeek and Fliers 2013; López-Olmeda et al. 2013). The reported 24-h fluctuations seem to be driven by both central and local oscillators such as the one located in the mammalian adrenal gland (Nader et al. 2010; Kalsbeek et al. 2012). In goldfish (*Carassius auratus*), daily rhythms in the expression of some clock genes have been reported in central nervous system and also in peripheral tissues, including the liver (Feliciano et al. 2011; Nisembaum et al. 2012;

Sánchez-Bretaño et al. 2015a). However, a complete picture of rhythms of expression of all clock genes cloned to date in this species in the liver does not exist, and the existence of cortisol daily rhythms in this species is unclear. Moreover, if the goldfish hepatic oscillator is an endogenous clock (i.e. its rhythmicity is maintained in free running conditions, isolated of neural and humoral signals) is also unknown. Finally, although glucocorticoids modify clock gene expression in the liver of goldfish, as previously mentioned (Sánchez-Bretaño et al. 2016), to date, the role of glucocorticoids as temporal internal signals able to synchronize the liver in teleost has not been unraveled. Thus, the main objective of the present study was first to investigate the hepatic oscillator functioning in the presence of both light-dark cycle and scheduled feeding regime synchronizers in goldfish. Then, we characterized the possible daily profile of cortisol plasmatic levels and, finally, we aimed to deep into the role of glucocorticoids as direct synchronizers of the hepatic clock gene expression in this teleost.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and housing

Goldfish ( $25 \pm 2$  g, except otherwise specified) were maintained in 60 l aquaria with filtered and aerated fresh water ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) under a 12 h light: 12 h darkness (12L:12D) photoperiod (lights on at 8 am consider as *zeitgeber* time (ZT) 0). Fish were daily fed at ZT 2 with food pellets (1% body weight; Bioflakes, Sera Pond, Heidelberg, Germany). All the fish handling procedures comply with the international standards for the Care and Use of Laboratory Animals, were approved by the Animal Experiments Committee of the Complutense University of Madrid, and were in accordance with the Guidelines of the European Union Council (2010/63/EU) for the use of research animals.

### **In vivo study of hepatic clock genes expression, plasmatic cortisol and locomotor activity daily patterns in goldfish**

After a 20-day, goldfish ( $7 \pm 2$  g) were anesthetized and sacrificed at 4-hr intervals

throughout a 24 h cycle ( $n = 6/\text{sampling point}$ ). Food was offered as scheduled (ZT 2) the day of the experiment. Samples of liver were quickly collected, immediately frozen in liquid nitrogen and maintained at  $-80^\circ\text{C}$  until clock genes expression was measured by Real Time PCR (RT-qPCR).

### Plasma cortisol assay

After a 20-day acclimation period acclimation (in which locomotor activity was registered as below described), goldfish ( $7 \pm 2$  g) were anesthetized at 4-hr intervals throughout a 24 h cycle ( $n = 6/\text{sampling point}$ ). At each sampling point blood was collected and plasma was separated by centrifugation at 6000 rpm during 4 min. Then plasma samples were conserved at  $-20^\circ\text{C}$  until cortisol levels were analysed.

Plasma cortisol levels were determined by enzimoimmunoassay (ELISA) using a commercial kit (Demeditec, Schleswig-Holstein, Germany), previously validated for goldfish plasma. The limit of detection calculated in our laboratory was 4.35 ng/ml. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 4% and 7% (20 ng/ml) and 5% and 9% (100 ng/ml), respectively.

### Locomotor activity determination

Locomotor activity was recorded during all the acclimation period by 6 infrared photocells (Omron Corporation, E3S-AD12, Japan) fixed on the aquarium wall. Each photocell continuously emitted an infrared light beam, which was interrupted each time fish swam in that zone, generating an output signal. The number of light beam interruptions was automatically registered every 10 min by a computer with specific software (Micronec, Spain). The aquaria walls were covered with opaque paper to minimize external interferences during the experiments. Data were analyzed and circadian period of daily activity rhythm was calculated by constructing chi-square periodograms with a significance level set at 0.05 (data not shown) using the chronobiology software EL TEMPS® (Prof. Antoni Díez Noguera, University of Barcelona).



## ***In vitro* study of hepatic clock genes expression and effects of dexamethasone**

### **1. Reagents**

Dexamethasone (DEX) stock solution (Sigma Aldrich, CA, USA) was prepared in stiller water at a concentration of 100  $\mu$ M. Then, DEX stock solution was diluted in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma Aldrich, CA, USA) up to a 100 nM concentration.

### **2. Liver cultures**

Cultures were performed as previously described (Sánchez-Bretaña et al. 2015b). Goldfish (starved the day of the experiment) were sacrificed at ZT 2 and livers were quickly sampled and distributed in different wells (15 mg/well) of sterile culture 24-well multidish plates. One portion of liver from each fish was employed in each experimental group (the exact number of animals used in each experiment is indicated below). Plates were preincubated for 2 h in 1 ml of DMEM before the beginning of the experiments. Then, medium was replaced by 1 ml of DMEM alone (control groups) or containing dexamethasone (100 nM) depending on the experiment, and plates were incubated during the time indicated below. The cultures were performed under dim light conditions and 20°C temperature. At the end of each experiment, liver samples were collected, quickly frozen in liquid nitrogen and maintained at -80°C until clock gene expression was measured. Cell viability was determined by PrestoBlue® (Invitrogen, Carlsbad, USA) each day during a week, and results indicate that the tissue was in good conditions for at least one week in culture when medium was replaced each 24 h (data not shown).

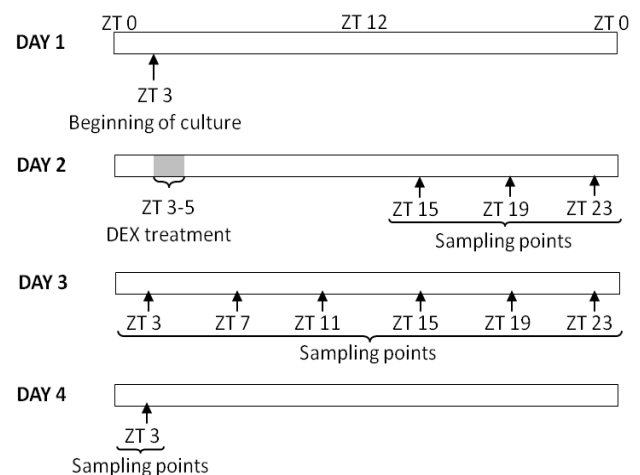
### **3. Experimental designs employed for *in vitro* approaches**

#### **3.1. Study of clock genes expression daily pattern in liver cultures**

For studying the possible rhythmic expression of clock genes *in vitro*, liver aliquots (n = 6 liver aliquots/group) were incubated with DMEM during 24 h and then, samples were collected every 4 h throughout the next 24-h cycle starting at CT 3. The Circadian Time (CT) was determined by the ZT of the animals before being sacrificed (CT 0 corresponds to ZT 0 that corresponds to the beginning of the light period of the day).

#### **3.2. Effect of a transient (2 h) dexamethasone treatment on clock genes expression rhythmicity in liver cultures**

This design is showed in the Fig. 1. Liver aliquots (n = 6 liver aliquots/group) were incubated with DMEM during 24 h. Then, medium was replaced with medium alone (control group) or supplemented with dexamethasone (100 nM, dexamethasone treated group), and plates were incubated during 2 h. From the beginning of the treatment, livers of both groups were incubated again with medium alone for 48 h (medium was renewed after 24 h). Samples were collected in 4-h intervals starting 12 h after the beginning of the dexamethasone treatment among 36 h. CT was determined by the ZT of the animals when they were sacrificed (CT 0 corresponds to ZT 0 that corresponds to the beginning of the light period of the day).



**Figure 1. Experimental design to study the effect on clock genes expression rhythmicity of a 2-h dexamethasone treatment on cultured goldfish liver.** Liver were collected at ZT 2 (being the beginning of the culture at ZT 3) and preincubated during 24 h. Then, medium was replaced by medium alone or supplemented with dexamethasone (100 nM) and incubated during 2 h. After that, medium was replaced again by medium alone and maintained 46 h in culture. Samples were collected in 4-h from 12 h after the beginning of the dexamethasone treatment among 36 h. CT was determined by the ZT of the animals when they were sacrificed (CT 0 corresponds to ZT 0 that corresponds to the beginning of the light period of the day).

### **Clock genes expression analysis**

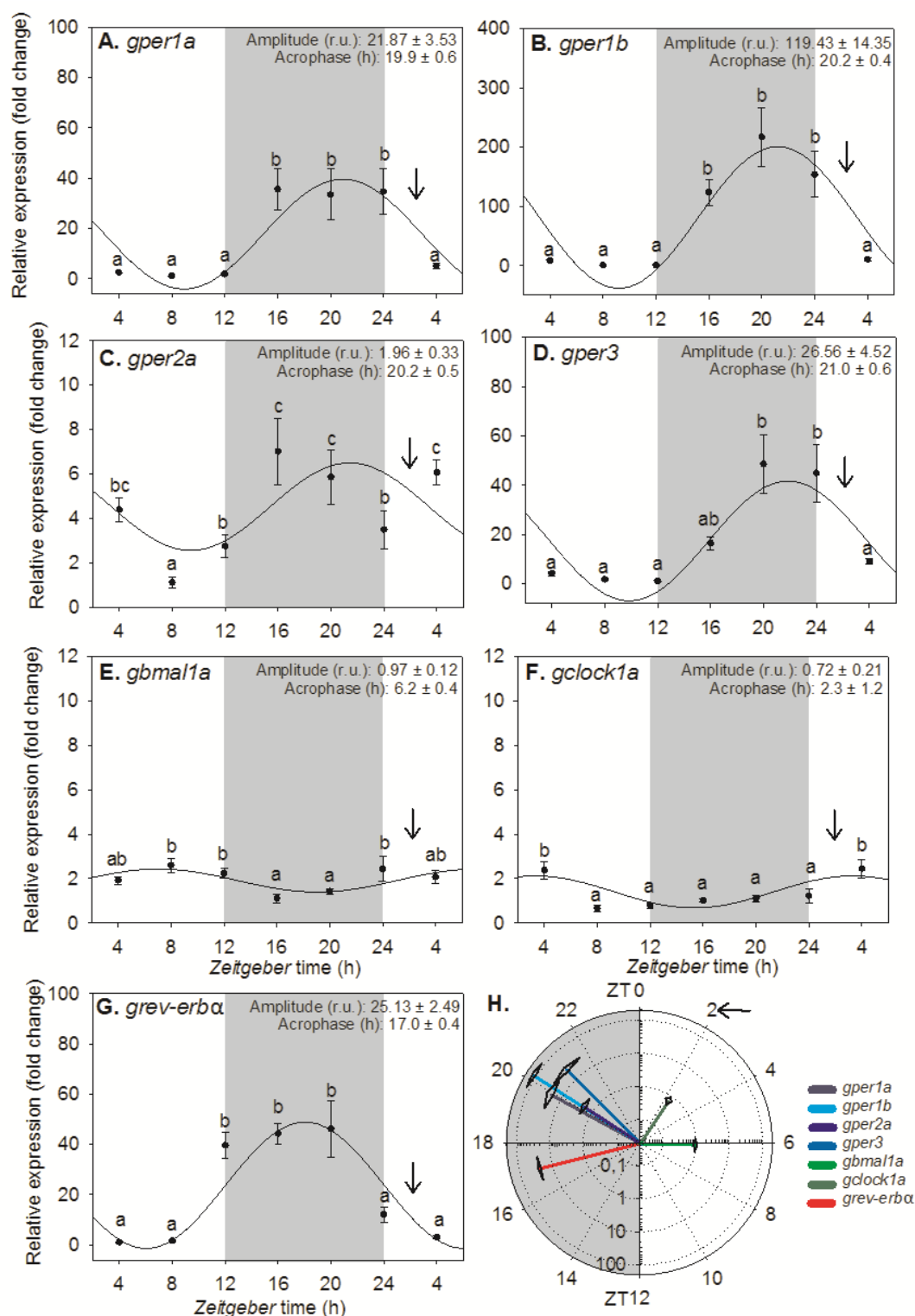
Clock genes expression (*gper1a*, *gper1b*, *gper2a*, *gper3*, *gbmalla*, *gclock1a* and *grev-erba*) was measured in all the samples by RT-qPCR, using

*gβ-actin* as a reference gene as previously described (Nisembaum et al. 2014; Sánchez-Breña et al. 2015b). Specific primers (Sigma, Chemical, Madrid, Spain) and Gene Data Bank reference numbers are shown in Table 1. RNA extraction (TRI® Reagent method, Sigma Chemical, Madrid, Spain), DNase treatment (Promega, Madison, USA), cDNA synthesis (Invitrogen, Carlsbad, USA) and real-time PCR reactions (iTaQ™ SYBR® Green Supermix in a CFX96™ Real-Time System, Biorad Laboratories, Hercules, USA) were carried out following manufacturer instructions with minor modifications. Total RNA (1 µg) was retrotranscribed and PCR reactions were developed in a final volume of 10 µl (1 µl of cDNA per sample). PCR conditions were 30

seconds at 95°C, and 40 cycles consisting of 5 sec at 95°C and 30 sec at 60°C for all genes. Calibration curves, made with serial dilutions of cDNA, exhibited efficiencies around 100%. Specificity of amplifications was tested by melting curves and also the size of the amplicon by agarose gels. Negative controls included the employment of water and non-retrotranscribed total RNA. The relative mRNA expression was determined by  $\Delta\Delta C_t$  method (Livak and Schmittgen 2001). The data obtained in the *in vivo* study were normalized to the group with lowest expression of each gene. The data obtained in the *in vitro* studies were normalized to the first sampling point in all cases. In the case of the experiment of dexamethasone treatment, data were normalized to the first control group.

Table 1. Accession numbers of the genes and primers sequences employed in quantitative RT-qPCR studies.

Target gene	Accession number		Primer sequence 5' → 3'	Product (bp)
<i>gper1a</i>	EF690698	Forward	CAGTGGCTCGAATGAGCACCA	155
		Reverse	TGAAGACCTGCTGTCCGTTGG	
<i>gper1b</i>	KP663726	Forward	CTCGCAGCTCCACAAACCTA	159
		Reverse	CACAACAGCTGCAGAGGAAT	
<i>gper2a</i>	EF690697	Forward	TTTGTCAATCCCTGGAGCCGC	116
		Reverse	AAGGATTTGCCCTCAGCCACG	
<i>gper3</i>	EF690699	Forward	GGCTATGGCAGTCTGGCTAGTAA	130
		Reverse	CAGCACAAAACCGCTGCAATGTC	
<i>gbm11a</i>	KF840401	Forward	AGATTCTGTTTCGTCTCGGAG	161
		Reverse	ATCGATGAGTCGTTCCCGTG	
<i>gclock1a</i>	KJ574204	Forward	CGATGGCAGCATCTCTTGTGT	189
		Reverse	TCCTGGATCTGCCGAGTTCAT	
<i>grev-erba</i>	KU242427	Forward	CGTTCATCTCAGGCACCACT	166
		Reverse	AACTGACCTGCAGACACCAG	
<i>β-actin</i>	AB039726	Forward	CAGGGAGTGATGGTTGGCA	168
		Reverse	AACACGCAGCTCGTTGTAGA	



**Figure 2. Daily expression of clock genes in the liver of goldfish.** Animals were maintained under a 12L:12D photoperiod and fed daily at ZT 2 (black arrows). A-G. Data obtained by RT-qPCR are shown as the mean  $\pm$  s.e.m. ( $n=7$ ) in relative units ( $\Delta\Delta C_t$  method). Black lines represent the periodic sinusoidal functions determined by the cosinor analysis when a significant rhythm was detected ( $p < 0.05$  by ANOVA and  $SE(A)/A < 0.3$ ), the acrophase and amplitude of such rhythms are showed in the upper right of the graph. Different letters indicate significant differences by ANOVA and post-hoc SNK test ( $p < 0.05$ ). H. Parameters defining the clock genes expression rhythms (acrophases and amplitudes) from A-G are presented as polar plots. The length of the vector (radial axis) indicates the logarithm of amplitude of the rhythm (relative expression, fold change), while the angular position indicates the acrophase (ZT, hour). The s.e.m. of these two parameters is represented by rhombus at the end of the vector. A-H. The grey area indicates the dark phase of the daily photocyclus and the black arrow indicates the scheduled feeding time (ZT 2). The data obtained were normalized to the group with lowest expression of each gene.

## Data analysis

A one-way ANOVA followed by the post-hoc Student Newman Keuls (SNK) test was performed for data from the analysis of clock genes expression in liver *in vivo* and *in vitro*. Data from the cultures treated with dexamethasone was analyzed by a two-way ANOVA followed by SNK post-hoc test (factors: treatment and time of culture) and by a Student t-test (at each time point). When necessary, data were transformed to logarithmic or square root scale to normalize and to obtain homocedasticity. A probability level of  $p < 0.05$  was considered statistically significant in all test.

Daily (24-h) rhythms in clock genes expression were determined by fitting the data to a sinusoidal function by the least squares method described by (Duggleby 1981). The formula used was  $f(t) = M + A \cos(\pi/12 - \phi)$ , where  $f(t)$  was the gene expression level at a given time, the mesor ( $M$ ) is the mean value,  $A$  is the sinusoidal amplitude of oscillation,  $t$  is time in hours, and  $\phi$  is the acrophase (time of peak expression). Non-linear regression allows the estimation of  $M$ ,  $A$ , and  $\phi$ , and their standard error (SE), being the SE based on the residual sum of squares in the least-squares fit (Duggleby 1981). Significance of cosinor analysis was defined by the noise/signal of amplitude calculated from the ratio  $SE(A)/A$  (Nisembaum et al. 2012). Expression was considered to display a daily rhythm if it had both  $p < 0.05$  by ANOVA and  $SE(A)/A < 0.3$  by cosinor analysis.

## RESULTS

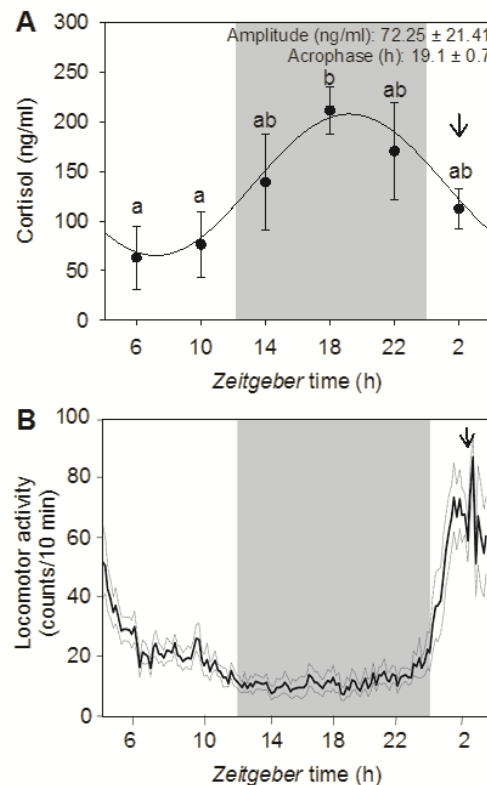
### Clock genes expression rhythms in the liver *in vivo*

Goldfish maintained under a 12L:12D photoperiod and scheduled fed at ZT 2 showed significant daily expression rhythms for all the clock genes analysed (Fig. 2). The acrophases observed for *gper* and *grev-erba* genes (around 19 and 21 h; in the dark phase) were opposite to the ones observed for *gbmala* and *gclock1a* genes (6.2 and 2.3 h respectively; in the light phase). The amplitude of the rhythms was variable, being the amplitude of *gper1b* the highest (close 120) and the one of *gclock1a* the

lowest (two orders of magnitude lower compared with *gper1b* amplitude; Fig. 2).

### Plasmatic cortisol and locomotor activity rhythms

Figure 3A shows the plasmatic cortisol levels of goldfish maintained in 12L:12D and scheduled fed at ZT 2 throughout a 24 h photocycle. Cortisol showed a daily rhythm, with the highest values at the middle of the dark phase (around ZT 19 h). These animals also showed significant locomotor activity rhythm with a marked diurnal pattern (Fig. 3B) and a period of 24 h. The highest activity levels correspond to the onset of the light phase and before the meal time (Fig. 3B), some hours after the nocturnal cortisol peak.



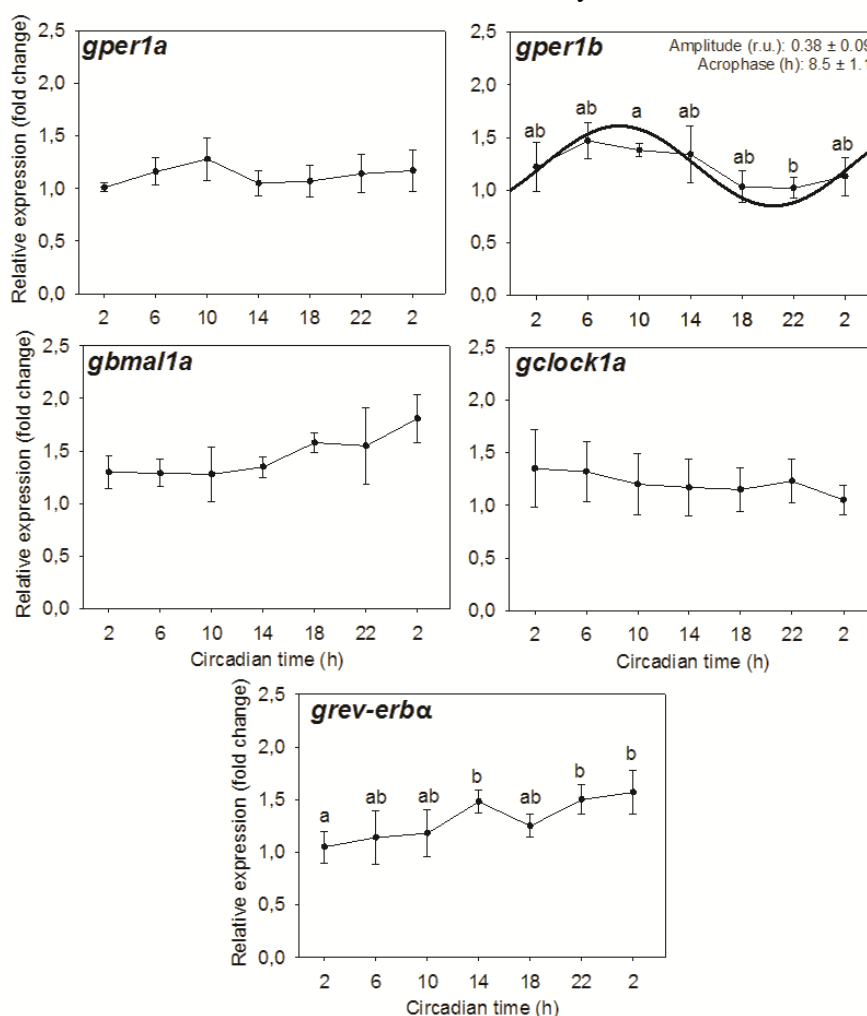
**Figure 3. Plasma cortisol levels and locomotor activity pattern of goldfish through a 24 h cycle.** A. Daily plasma cortisol levels. Data obtained by ELISA are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. ( $n=5$ ). Black lines represent the periodic sinusoidal functions determined by cosinor analysis of the significant rhythm detected ( $p < 0.05$  by ANOVA and  $SE(A)/A < 0.3$ ), the acrophase and amplitude of such rhythm are showed in the upper right of the graphs. B. Daily profile of locomotor activity. Average waveforms of locomotor activity were calculated for 15 consecutive days (black line represents the mean and grey lines represents the s.e.m.). A-B. The grey area indicates the dark phase of the daily photocycle and the black arrow indicates the scheduled feeding time (ZT 2).

### Clock genes daily expression pattern in the liver *in vitro*

After 24 h in culture, the daily clock genes expression pattern observed *in vivo* was completely abolished (Fig. 4). Any of the clock genes analysed, including both the genes from the negative or positive limbs of the main loop and the genes from the auxiliary loop, showed rhythmicity after 24 h in cultured liver, with the exception of *gper1b* which displays a circadian rhythmicity with an amplitude of 0.38 (100 fold lower than *in vivo*) and an acrophase (CT 8.5 h) around 12-h shifted comparing with the *in vivo* results (ZT 20.2 h).

### Effect of a transient dexamethasone treatment on clock genes expression rhythms in the liver *in vitro*

The liver treated with dexamethasone 100 nM during 2 h showed significant 24-h expression rhythms in all the clock genes that were analysed among more than 24 hours (12 h to 36 h) after dexamethasone was removed (Fig. 5). Such rhythms were absent in medium-alone (dexamethasone free) incubated liver in any studied clock gene. Moreover, the acrophase in expression observed for *gper* and *grev-erba* (10.6 – 12.4 h) was 12 h shifted with *gbmal1a* and *gclock1a* (0.1 – 22.2 h), as occurred *in vivo*. It is also remarkable the fact that the time between peaks or valleys (i.e. the period of the rhythms) was always around 24 h.

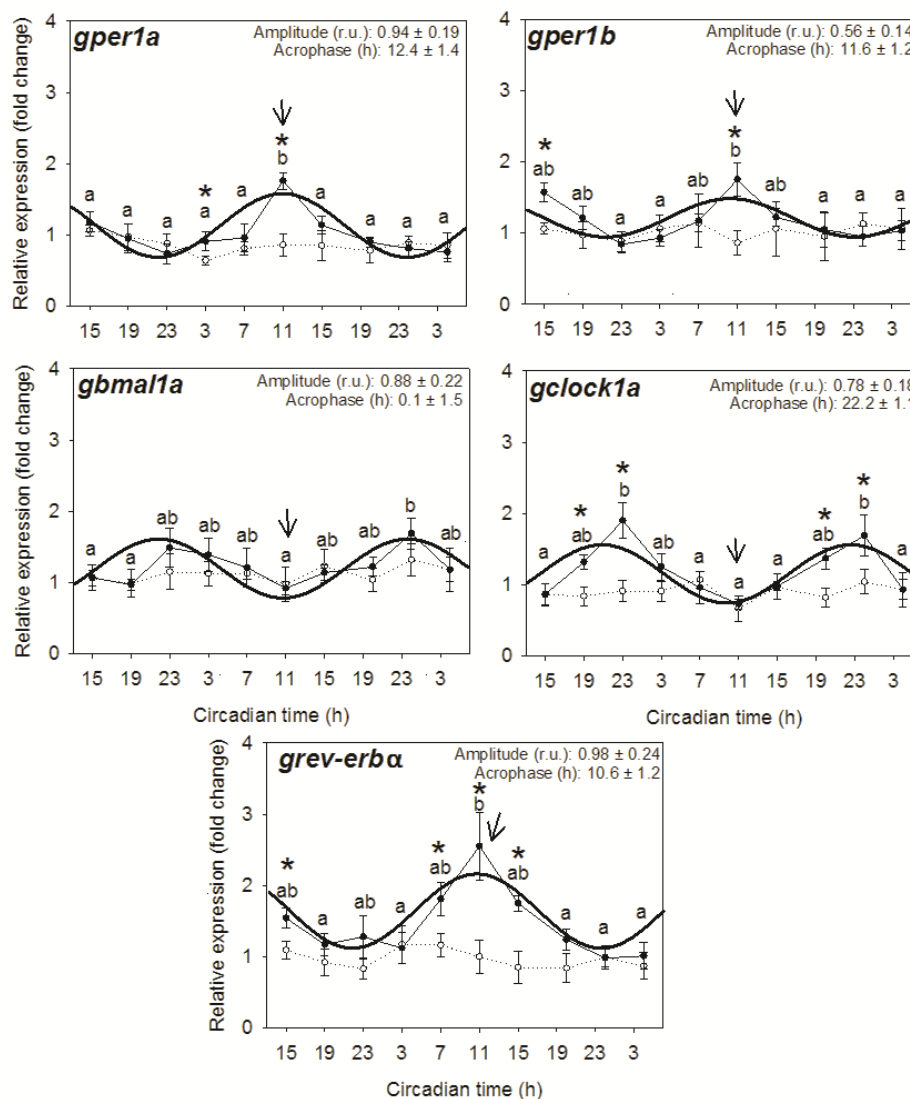


**Figure 4. Clock genes expression in liver of goldfish *in vitro*.** Data obtained by RT-qPCR are shown as the mean  $\pm$  s.e.m. (n=6) in relative units ( $\Delta\Delta C_t$  method). Black thick line represents the periodic sinusoidal functions determined by the cosinor analysis when a significant rhythm was detected (only for *gper1b*,  $p < 0.05$  by ANOVA and  $SE(A)/A < 0.3$ ), the acrophase and amplitude of such rhythm are showed in the upper right of the graph. CT was determined by the ZT of the animals when they were sacrificed (CT 0 corresponds to ZT 0 that corresponds to the beginning of the light period of the day). The data obtained were normalized to the first sampling point in all cases.

## DISCUSSION

Present results show for the first time in goldfish the daily expression profiles of a set of clock genes (including negative and positive elements of the main loop as well as an element of the auxiliary loop) in the liver in the presence of both synchronizers light-dark cycle and scheduled feeding time. Rhythms found follow the expected molecular clock functioning of an oscillator (i.e. in terms of feedback loops) (Reppert and Weaver 2002; Hastings et al. 2007; Nader et al. 2010; Buhr and Takahashi 2013; Partch et al. 2014; Schibler et al. 2015). Thus, when analysing the main loop, negative elements (*gper* genes) are in antiphase with positive elements (*gbmalla* and

*gclock1a*). Moreover, *grev-erb $\alpha$*  the gene from the auxiliary loop responsible for repressing *gbmalla* gene expression (Schibler et al. 2015) is in phase with the negative elements and in antiphase with the positive ones. The acrophase of *per* genes at the end of the scotophase is also in accordance with previous results in different oscillators of goldfish maintained under the same conditions of light and feeding (Sánchez-Bretaño et al. 2015b), which indicates that all of these oscillators in the organism are in phase. Moreover, the fact that the hepatic *per* acrophases are located at the end of the scotophase could let us suggest that *per* genes anticipates both the onset of the photophase and food arrival.



**Figure 5. Relative expression of clock genes in liver of goldfish *in vitro* treated with dexamethasone (100 nM) during 2 h.** Data obtained by RT-qPCR are shown as the mean  $\pm$  s.e.m. (n=6) in relative units ( $\Delta\Delta Ct$  method). Control group: white marks and dotted lines. Dexamethasone treated group: black marks and continuous line. No significant differences were found in the control group (neither by ANOVA nor by cosinor analysis). In the dexamethasone treated group different letters indicate significant differences by ANOVA and post-hoc SNK test ( $p < 0.05$ ), while the continuous black thick lines represent the periodic sinusoidal functions determined by the cosinor analysis when rhythms were significant. The asterisks



indicate T-student differences between control and dexamethasone-treated groups ( $p < 0.05$ ). The values of the acrophase and the amplitude of such rhythms are shown in the upper right corner of the graph. Black arrows indicate the sampling point that coincides with 24 h after the treatment with dexamethasone. CT was determined by the ZT of the animals when they were sacrificed (CT 0 corresponds to ZT 0 that corresponds to the beginning of the light period of the day). Data were normalized to the first sampling point of the control group.

The positive elements of the main loop and auxiliary loop have been less studied; only few studies show the rhythmicity of *gbmalla*, *gclock1a* or *grev-erb*  $\alpha$  genes in the teleostean liver (Martín-Robles et al. 2012; Betancor et al. 2014). In the case of *bmall1*, present results are in accordance with the previously reported for Atlantic salmon as in fish maintained in a long day conditions (16L:8D) and fed continuously, this gene shows a daily expression pattern with the acrophase in the light phase (Betancor et al. 2014). However, the rest of the genes analysed in this teleost showed no rhythmicity in this environmental conditions. In addition, present results are opposite with the previously reported for a nocturnal teleost, Senegale sole (*Solea senegalensis*), maintained in light-dark photoperiod and fed 3 times per day, where *per* genes peaked during the light phase, *clock* gene during the dark phase in the liver (Martín-Robles et al. 2012). Moreover under such conditions in the sole, encephalic rhythms were shifted with regard to the liver (Martín-Robles et al. 2012), in contrast with the observed in goldfish in which all oscillators (central and peripheral) seem to be in phase (as above discussed; Feliciano et al. 2011; Sánchez-Bretaña et al. 2015b). It would be interesting to investigate if this fact is a consequence of a shift in the behaviour (nocturnal vs diurnal) of these two teleost species under the environmental conditions tested.

Surprisingly, when the liver is isolated and maintained *in vitro* during 24 h (to 48 h), clock genes rhythmicity disappeared in all the genes analysed, with the exception of *gper1b* gene, which amplitude drastically decreased (from 120 to 0.4 relative units). These facts indicate that the change to *in vitro* conditions is a huge challenge to the clock that is only tolerated by the strong amplitude of *gper1b*, suggesting that *in vivo* the hepatic oscillator is probably responding to multiple cues. In mammals it has proposed a model in which the hepatic clock genes are sensible to multiple cues and only when isolated, rhythms are unique driven by the E-box element

in the promoter of the genes (Schibler et al., 2015). This seem to be the case also in goldfish, as *gper1b* rhythmic expression is maintained with lower amplitude *in vitro* (in the absence of any other cue), and dexamethasone re-established rhythmic expression of all clock genes analyzed (below discussed) but even with lower amplitudes compared with the observed *in vivo*. Glucocorticoids have been proposed to be one of the most important signals that regulate peripheral endogenous oscillators in mammals (Reddy et al. 2007; Schmutz et al. 2012; Albrecht 2012; Sujino et al. 2012; Schibler et al. 2015). To drive clock genes oscillations, an internal messenger should be also rhythmic. In this work, we demonstrate that the endogenous glucocorticoid cortisol, displays a daily rhythm in the plasma of goldfish, with the highest levels during the scotophase, anticipating the activity phase. This is in accordance with previous results in other teleost species: diurnal, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Polakof et al. 2007) and brown trout (*Salmo trutta*, Pickering and Pottinger 1983); and nocturnal, Senegal sole, (López-Olmeda et al. 2013), and also in mammals (Kalsbeek et al. 2011; Kalsbeek et al. 2012; Kalsbeek and Fliers 2013), where cortisol peaks before or at the beginning of the activity phase. It is also interesting the fact that plasmatic cortisol acrophase is in phase with hepatic *per* genes since it has been previously reported that glucocorticoids induce *per* genes in the liver of vertebrates (Balsalobre et al. 2000; Yamamoto et al. 2005; So et al. 2009; Sujino et al. 2012), including goldfish (Sánchez-Bretaña et al. 2016). In this species, previous studies have demonstrated that glucocorticoids not only induce *per* genes, but also halved the expression of *gbmalla* and *gclock1a* in cultured liver (Sánchez-Bretaña et al. 2016), suggesting a putative role of these hormones to shift the phase of the hepatic clock. The amount of circulating cortisol detected (50-100 ng/ml during the day and 200-250 ng/ml during the night) are in the range of physiological levels previously detected in this species (de Pedro et

al. 1997; Bernier et al. 1999). Considering that glucocorticoids are one of the most important systemic signals that modulates peripheral oscillators in mammals as above mentioned (Reddy et al. 2007; Schmutz et al. 2012; Albrecht 2012; Sujino et al. 2012; Schibler et al., 2015), together with the clear rhythmicity of plasmatic cortisol found here in goldfish, and that in this species previous results show that a short-term glucocorticoids exposure modulates clock genes expression in the liver *in vitro* (Sánchez-Bretaña et al. 2016), we aimed to study whether the glucocorticoid analogue, dexamethasone, is able to re-establish the expression rhythms of the molecular components of the clock, that were lost in cultured liver. What we found is that, a transient exposure of liver cultures to dexamethasone (2 h) induced rhythmicity of all the genes studied (analysed since 12 h to 36 h after the dexamethasone-pulse). The dexamethasone concentration used in this experiment (100 nM) is the same previously reported to induce bioluminescence rhythms in *zfp1b-Luc* transfected zebrafish and cavefish cells (Cavallari et al. 2011), as well as to modulate clock genes expression in rat fibroblasts and mammalian cell lines (Balsalobre et al. 2000; Xydous et al. 2012), and even lower to the ones reported to induce the oscillation of *Bmal1* gene in mammalian mesenchymal stem cells (So et al. 2009). Moreover, the peak of expression found in the positive elements (*gbmalla* and *gclockla*) in dexamethasone treated liver appeared with 12 h of delay compared to the observed for the negative elements and *grev-erbα*, indicating a possible functional resynchronization of the hepatic oscillator by the 2-h pulse of the glucocorticoid. This suggests a conservative role of glucocorticoids in the functional organization of the liver as a key element of the peripheral circadian system in vertebrates. Besides, the recent results in goldfish above mentioned, showing an opposite effect of a short-term dexamethasone treatment, inducing the negative elements and repressing the positive ones in the cultured liver (Sánchez-Bretaña et al. 2016), could be the basis of a possible glucocorticoid-dependent entrainment of the hepatic clock.

Another observation derived from the present study is the fact that, because an *in vitro* model was used for the assays, the glucocorticoid signalling on clock genes is acting directly on the liver as a target. Indeed, glucocorticoid receptors have been reported in the liver of some teleosts (Aluru and Vijayan 2007; LaLone et al. 2012; Teles et al. 2013). Thus, present results from liver cultures support the physiological relevance of glucocorticoid effects on clock genes expression in goldfish liver.

The physiological meaning of the synchronization of hepatic oscillator by glucocorticoids remains to be investigated. In addition, most of the genes that show circadian oscillations in liver are related to metabolic processes (Oishi et al. 2005; Reddy et al. 2007). Then, it makes sense to have a cross-talk between metabolic signals and the circadian system in order to maintain optimum conditions for the liver, and even, for the whole organism functioning. Glucocorticoids could be the link between these two systems also in teleost as proposed in mammals (Reddy et al. 2007; Schmutz et al. 2012; Albrecht 2012; Sujino et al. 2012; Schibler et al. 2015).

In summary, here we have showed the molecular functioning (in terms of clock genes rhythms) of the hepatic oscillator in presence of light-dark cycle and scheduled feeding regime as well as the existence of a daily rhythm of plasmatic cortisol with an acrophase before the activity phase of the animals. We have also demonstrated the role of glucocorticoids as direct synchronizers of the hepatic oscillator *in vitro*, being able to adjust the functioning of all the elements of the clock that have been studied (negative and positive elements of the main loop and the auxiliary loop). Further studies are required to better understand the physiological relevance of glucocorticoids as signals that synchronize the peripheral oscillators in goldfish. However from present results it seems that although fish circadian system organization is less hierarchical than the mammalian one (Vatine et al. 2011; Moore and Whitmore 2014), circadian system organization at peripheral level could be conserved in vertebrates.



## COMPETING INTEREST

No competing interest declared.

## ETHICAL APPROVAL

All applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.S.B., E.I., A.L.A.G. and M.J.D. conceived and designed the experiments, and interpreted the findings. A.S.B. and E.I. performed the experiments. A.S.B. and E.I. collected and analyzed the data. All authors drafted and revised the article.

## Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness project [MINECO; AGL2013-46448-C3-2-R]. A.S-B. was funded by FPI grant [BES-2011-047620] from MINECO.

## REFERENCES

Adamovich Y, Roussou-Noori L, Zwighaft Z, et al (2014) Circadian clocks and feeding time regulate the oscillations and levels of hepatic triglycerides. *Cell Metab* 19:319–330.

Albrecht U (2012) Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 74:246–260.

Aluru N, Vijayan MM (2007) Hepatic transcriptome response to glucocorticoid receptor activation in rainbow trout. *Physiol Genomics* 31:483–491.

Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, et al (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289:2344–2347.

Bernier NJ, Lin X, Peter RE (1999) Differential expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and urotensin I precursor genes, and evidence of CRF gene expression regulated by cortisol in goldfish brain. *Gen Comp Endocrinol* 116:461–477.

Betancor MB, McStay E, Minghetti M, et al (2014) Daily rhythms in expression of genes of hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS ONE*. 9: e106739

Buhr ED, Takahashi JS (2013) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol* 3–27.

Cavallari N, Frigato E, Vallone D, et al (2011) A Blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *PLoS Biol* 9:e1001142.

De Ita-Pérez D, Méndez I, Vázquez-Martínez O, et al (2014) Synchronization by food access modifies the daily variations in expression and activity of liver GABA transaminase. *BioMed Res Int* 2014:590581.

de Pedro N, Alonso-Gómez AL, Gancedo B, et al (1997) Effect of alpha-helical-CRF[9-41] on feeding in goldfish: involvement of cortisol and catecholamines. *Behav Neurosci* 111:398–403.

Duggleby RG (1981) A nonlinear regression program for small computers. *Anal Biochem* 110:9–18.

Dunlap JC (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96:271–290.

Eckel-Mahan K, Sassone-Corsi P (2013) Metabolism and the circadian clock converge. *Physiol Rev* 93:107–135.

Feliciano A, Vivas Y, de Pedro N, et al (2011) Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J Biol Rhythms* 26:24–33.

Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES (2007) Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol* 195:187–198.

- Kalsbeek A, Fliers E (2013) Daily regulation of hormone profiles. *Handb Exp Pharmacol* 185–226.
- Kalsbeek A, van der Spek R, Lei J, et al (2012) Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Mol Cell Endocrinol* 349:20–29.
- Kalsbeek A, Yi C-X, Cailotto C, et al (2011) Mammalian clock output mechanisms. *Essays Biochem* 49:137–151.
- LaLone CA, Villeneuve DL, Olmstead AW, et al (2012) Effects of a glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone, on fathead minnow reproduction, growth, and development. *Environ Toxicol Chem* 31:611–622.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *25*:402–408.
- López-Olmeda JF, Blanco-Vives B, Pujante IM, et al (2013) Daily rhythms in the hypothalamus-pituitary-interrenal axis and acute stress responses in a teleost flatfish, *Solea senegalensis*. *Chronobiol Int* 30:530–539.
- López-Olmeda JF, Tartaglione EV, de la Iglesia HO, Sánchez-Vázquez FJ (2010) Feeding entrainment of food-anticipatory activity and *perl* expression in the brain and liver of zebrafish under different lighting and feeding conditions. *Chronobiol Int* 27:1380–1400.
- Martín-Robles ÁJ, Whitmore D, Sánchez-Vázquez FJ, et al (2012) Cloning, tissue expression pattern and daily rhythms of *Period1*, *Period2*, and *Clock* transcripts in the flatfish Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *J Comp Physiol [B]* 182:673–685.
- Moore HA, Whitmore D (2014) Circadian rhythmicity and light sensitivity of the zebrafish brain. *PLoS ONE* 9:e86176.
- Nader N, Chrousos GP, Kino T (2010) Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol Metab* 21:277–286.
- Nisembaum LG, de Pedro N, Delgado MJ, Isorna E (2014) Crosstalking between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *Gen Comp Endocrinol* 205:287–295.
- Nisembaum LG, Velarde E, Tinoco AB, et al (2012) Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol Int* 29:665–673.
- Oishi K, Amagai N, Shirai H, et al (2005) Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res Int* 12:191–202.
- Ota T, Fustin J-M, Yamada H, et al (2012) Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 349:30–37.
- Panda S, Hogenesch JB, Kay SA (2002) Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417:329–335.
- Paredes JF, Vera LM, Martínez-López FJ, et al (2014) Circadian rhythms of gene expression of lipid metabolism in Gilthead Sea bream liver: synchronisation to light and feeding time. *Chronobiol Int* 31:613–626.
- Partch CL, Green CB, Takahashi JS (2014) Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol* 24:90–99.
- Pérez-Mendoza M, Rivera-Zavala JB, Díaz-Muñoz M (2014) Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: adaptations in biochemical and endocrine regulators. *Chronobiol Int* 31:815–828.
- Pickering AD, Pottinger TG (1983) Seasonal and diel changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta L.* *Gen Comp Endocrinol* 49:232–239.
- Polakof S, Ceinos RM, Fernández-Durán B, et al (2007) Daily changes in parameters of energy

- metabolism in brain of rainbow trout: dependence on feeding. *Comp Biochem Physiol A* 146:265–273.
- Reddy AB, Maywood ES, Karp NA, et al (2007) Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology* 45:1478–1488.
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935–941.
- Sánchez-Bretaña A, Alonso-Gómez ÁL, Delgado MJ, Isorna E (2015a) The liver as a component of the circadian system: integrating a network of signals. *Gen Comp Endocrinol.* 15: 213-216.
- Sánchez-Bretaña A, Gueguen M-M, Cano-Nicolau J, et al (2015b) Anatomical distribution and daily profile of *gper1b* gene expression in brain and peripheral structures of goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol Int* 32:889-902.
- Sánchez-Bretaña A, Callejo M, Montero M, et al (2016) Performing a hepatic timing signal: glucocorticoids induce *gper1a* and *gper1b* expression and repress *gclock1a* and *gpmalla* in the liver of goldfish. *J Comp Physiol B.* 186(1): 73-82.
- Schibler U, Gotic I, Saini C, et al (2015) Clock-Talk: Interactions between Central and Peripheral Circadian Oscillators in Mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* doi: 10.1101/sqb.2015.80.027490
- Schmutz I, Albrecht U, Ripperger JA (2012) The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Mol Cell Endocrinol* 349:38–44.
- So AY-L, Bernal TU, Pillsbury ML, et al (2009) Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *PNAS* 106:17582–17587.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, et al (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291:490–493.
- Sujino M, Furukawa K, Koinuma S, et al (2012) Differential entrainment of peripheral clocks in the rat by glucocorticoid and feeding. *Endocrinology* 153:2277–2286.
- Teles M, Boltaña S, Reyes-López F, et al (2013) Effects of chronic cortisol administration on global expression of GR and the liver transcriptome in *Sparus aurata*. *Mar Biotechnol* 15:104–114.
- Tsang AH, Barclay JL, Oster H (2014) Interactions between endocrine and circadian systems. *J Mol Endocrinol* 52:R1–16.
- Valdés-Fuentes M, Vera-Rivera G, De Ita-Pérez D, et al (2015) Effect of daytime-restricted feeding in the daily variations of liver metabolism and blood transport of serotonin in rat. *Physiol Rep.* 3: e12389.
- Vatine G, Vallone D, Gothilf Y, Foulkes NS (2011) It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett* 585:1485–1494.
- Vera LM, Negrini P, Zagatti C, et al (2013) Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*). *Chronobiol Int* 30:649–661.
- Xydous M, Sekeri-Pataryas KE, Prombona A, Sourlingas TG (2012) Nicotinamide treatment reduces the levels of histone H3K4 trimethylation in the promoter of the *mper1* circadian clock gene and blocks the ability of dexamethasone to induce the acute response. *Biochim Biophys Acta* 1819:877–884.
- Yamamoto T, Nakahata Y, Tanaka M, et al (2005) Acute physical stress elevates mouse *period1* mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J Biol Chem* 280:42036–42043.

### **2.3. El oscilador hepático en carpín dorado. Modificaciones por el ciclo luz oscuridad, el horario de alimentación y hormonas.**

*The liver as a component of the circadian system: integrating a network of signals. General and Comparative Endocrinology (2015) 221: 213–216.*

#### **DISEÑO EXPERIMENTAL**

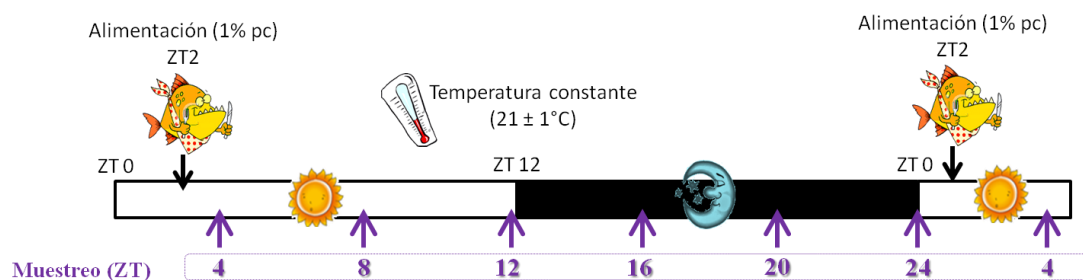
##### **1. Análisis de los patrones de expresión del gen reloj *gper1a* en el hígado de carpines mantenidos bajo diferentes condiciones ambientales.**

Como parte de la revisión realizada sobre la información existente del oscilador hepático del carpín se realizó una comparación de los ritmos de expresión del gen *gper1a* en carpines mantenidos bajo diferentes condiciones ambientales. En concreto se comparó el ritmo de *gper1a* en hígado de animales mantenidos en presencia de los dos sincronizadores externos principales (ciclo luz-oscuridad, 12L:12D, y ciclo ingesta ayuno, alimento a ZT 2), con los ritmos de animales mantenidos en presencia de uno de los dos sincronizadores (bien ciclo luz-oscuridad, bien ciclo ingesta-ayuno).

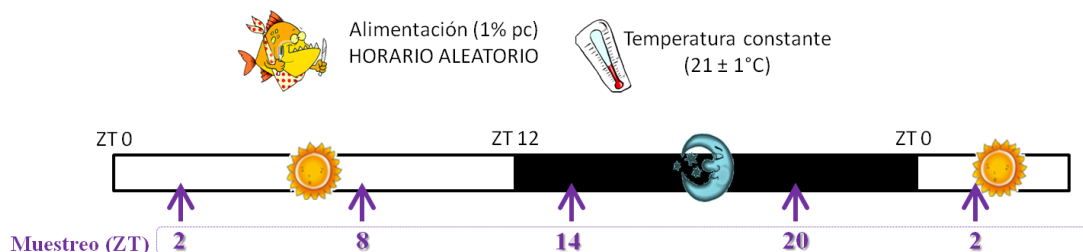
Para poder realizar la comparación se tomaron datos obtenidos en diferentes experimentos realizados por nuestro grupo de experimentación, diferenciando 3 grupos:

- En el primero, los carpines fueron mantenidos en presencia de un ciclo luz-oscuridad (12L:12D) y fueron alimentados diariamente en ZT 2. El día del experimento comieron en condiciones normales y se obtuvieron muestras de hígado en intervalos de 4 h.
- En el segundo, los carpines fueron mantenidos en presencia del mismo ciclo luz oscuridad, pero se alimentaron aleatoriamente. El día del experimento se obtuvieron muestras de hígado en intervalos de 6 h.
- En el tercero, los carpines fueron mantenidos en luz constante y fueron alimentados diariamente en ZT 2. El día del experimento se obtuvieron muestras de hígado en intervalos de 6 h.

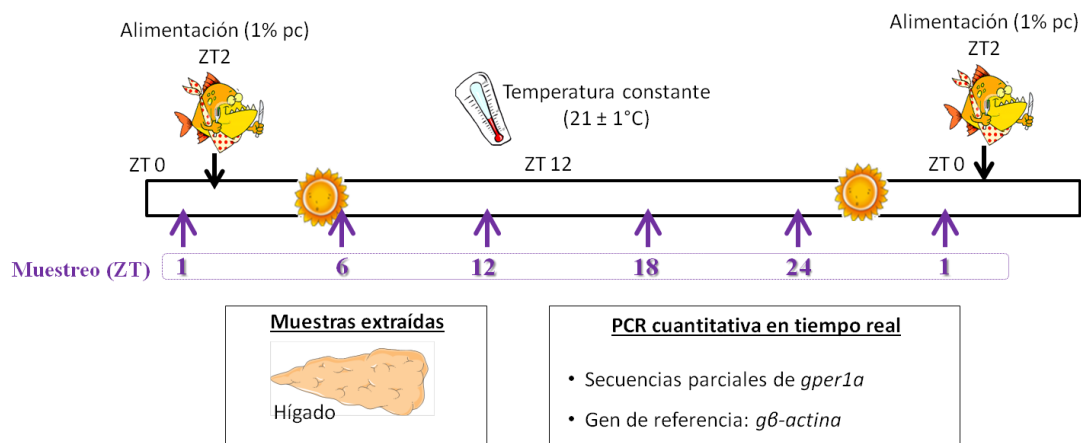
1) GRUPO LD + SF (ZT 2)



2) GRUPO LD + RF



3) GRUPO LL + SF (ZT 2)



**Figura C2.15. Diseños experimentales para la comparación de ritmos de *gper1a* en hígado en carpines mantenidos en diferentes condiciones externas.** 1) Carpines mantenidos en fotoperiodo 12L:12D y alimentados diariamente a ZT 2. 2) Carpines mantenidos en fotoperiodo 12L:12D y alimentados aleatoriamente. 3) Datos tomados de Tinoco et al., 2014. Carpines mantenidos en condiciones de luz constante y alimentados en ZT 2.



Contents lists available at ScienceDirect

## General and Comparative Endocrinology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ygcen](http://www.elsevier.com/locate/ygcen)



### Review

# The liver of goldfish as a component of the circadian system: Integrating a network of signals

Aída Sánchez-Bretaña, Ángel L. Alonso-Gómez, María J. Delgado, Esther Isorna \*

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

Article history:  
Available online xxxx

Keywords:  
Goldfish  
Liver  
Circadian system  
Clock gene  
Period

### ABSTRACT

The circadian system drives daily physiological and behavioral rhythms that allow animals to anticipate cyclic environmental changes. The discovery of the known as “clock genes”, which are very well conserved through vertebrate phylogeny, highlighted the molecular mechanism of circadian oscillators functioning, based on transcription and translation cycles (~24 h) of such clock genes. Studies in goldfish have shown that the circadian system in this species is formed by a net of oscillators distributed at central and peripheral locations, as the retina, brain, gut and liver, among others. In this work we review the existing information about the hepatic oscillator in goldfish due to its relevance in metabolism, and its key role as target of a variety of humoral signals. Different input signals modify the molecular clockwork in the liver of goldfish. Among them, there are environmental cues (photocycle and feeding regime) and different encephalic and peripheral endogenous signals (orexin, ghrelin and glucocorticoids). *Per* clock genes seem to be a common target for different signals. Thus, this genes family might be important for shifting the hepatic oscillator. The physiological relevance of the crosstalking between metabolic and feeding-related hormones and the hepatic clock sets the stage for the hypothesis that these hormones could act as “internal zeitgebers” communicating oscillators in the goldfish circadian system.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. The circadian system. The case of goldfish

Cyclic environmental changes have led to the emergence of the circadian system in all living organisms, which provides a mechanism to anticipate such external cyclic changes. In vertebrates this system consists of multiple central and peripheral oscillators that can be entrained by different environmental signals (Albrecht, 2012; Moore and Whitmore, 2014).

The molecular core of these biological clocks is based on inter-locked transcriptional and post-translational auto-regulatory feedback loops of a set of genes called clock genes (Albrecht, 2012; Vatine et al., 2011). In the main loop, the positive limb is formed by the transcription factor (heterodimer) CLOCK-BMAL1 that induces the expression of *period* (*per*) and *cryptochrome* (*cry*) genes, that form in turn the negative transcriptional limb. PER and CRY proteins dimerize and inhibit CLOCK-BMAL1 transactivation with an oscillation close to 24 h (Albrecht, 2012; Vatine et al., 2011).

Several humoral and neural signals ensures the coupling of this net of oscillators that in mammals is under the control of a master clock located in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus

(Albrecht, 2012). The existence of a master clock in teleosts has not been demonstrated to date, and then, fish circadian system is considered less hierarchical than the mammalian one (Moore and Whitmore, 2014; Weger et al., 2013). The presence of clock genes in a variety of tissues from different species supports the existence of an extended net of oscillators in teleost central and peripheral locations. Clock genes have been found in zebrafish (Vatine et al., 2011), and in a variety of tissues in other fish, including the retina, brain, pituitary, liver, skin, gut and gonads (Cavallari et al., 2011; Davie et al., 2009; Martín-Robles et al., 2011; Mazurais et al., 2000; Sánchez et al., 2010; Velarde et al., 2009; Vera et al., 2013).

Location of clock genes expression in specific encephalic nuclei of several fish species have been recently reported (Moore and Whitmore, 2014; Watanabe et al., 2012; Weger et al., 2013; own data presented in the 27th Conference of European Comparative Endocrinologists), but the functioning of fish circadian system remains an elusive issue. Moreover, in fish very little information exists on the possible role of humoral signals in the coupling among clocks.

In goldfish (*Carassius auratus*), daily rhythms of clock genes have been described in the retina, hypothalamus, optic tectum, pituitary, gut, liver and head kidney (Azpeleta et al., 2012; Feliciano et al., 2011; Nisembaum et al., 2014a, 2014b; Velarde et al., 2009). A comparative orthology of clock genes (from the

\* Corresponding author.

E-mail address: [eisornaa@bio.ucm.es](mailto:eisornaa@bio.ucm.es) (E. Isorna).

main loop) in mammals and fish is shown in Fig. 1. Online available sequences belonging to the main four families of clock genes have been used to create this figure (see the figure legend for details). In goldfish, as in other teleosts, a huge number of genes have been duplicated and some of these copies were lost during evolution in different groups (Meyer and Schartl, 1999; Vatin et al., 2011; Wang, 2008).

Considering the key role of the liver in the regulation of metabolism, the study of this organ as an oscillator (among the peripheral clocks), is crucial to understand the temporal relationship between metabolism and the circadian system. The hepatic oscillator in mammals is one of the most sensitive to different external cues, as feeding time and internal ones, as changes in circulating hormones, including glucocorticoids (Kornmann et al., 2007; Schmutz et al., 2012; Stokkan et al., 2001; Yamamoto et al., 2005). Thus, this organ seems to be an endogenous oscillator where the circadian information converges with the regulation of metabolism (Schmutz et al., 2012). This minireview shows the existing information on liver as a key peripheral oscillator in a teleost model, the goldfish.

## 2. Environmental synchronizers of the hepatic clock

In goldfish, the daily light–dark cycle and feeding schedule are able to synchronize two classic outputs (overt rhythms) of the circadian system, the daily locomotor activity and food anticipatory activity rhythms (Aranda et al., 2001; Feliciano et al., 2011). These two synchronizers also drive clock genes rhythms in the liver of this teleost (Fig. 2) with similar acrophases as reported in the brain (Azpeleta et al., 2012; Velarde et al., 2009). When only one signal (LD cycle or feeding time) is present, *Per1a* rhythms in the liver keep acrophases, but their amplitudes decrease (Fig. 2B and C; Feliciano et al., 2011; Tinoco et al., 2014), suggesting that both environmental signals works together in the sustaining

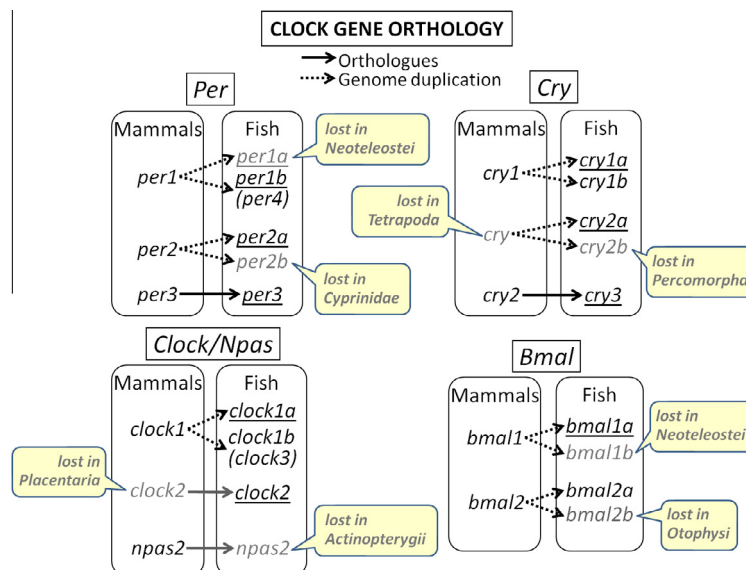
of the molecular clockwork in the liver. The amplitude of *Per1a* rhythm is higher in the hepatic oscillator than in the brain (Feliciano et al., 2011; Tinoco et al., 2014). In fact, the liver is highly sensitive to the feeding schedule in goldfish, as reported in mammals (Kornmann et al., 2007; Stokkan et al., 2001), since one meal might drive clock genes rhythms in this metabolic organ (Feliciano et al., 2011).

## 3. Hormonal signals as inputs of the hepatic oscillator

Besides the environmental cyclic changes that synchronizes the hepatic oscillator in goldfish, it is reported that clock genes in the goldfish liver could be regulated by different food-related peptides involved in energy balance (as ghrelin and orexin; Nisembaum et al., 2014a,b), and by glucocorticoid hormones (own data presented at the XIII Congress of the European Biological Rhythms Society). These data are summarized in the Fig. 3.

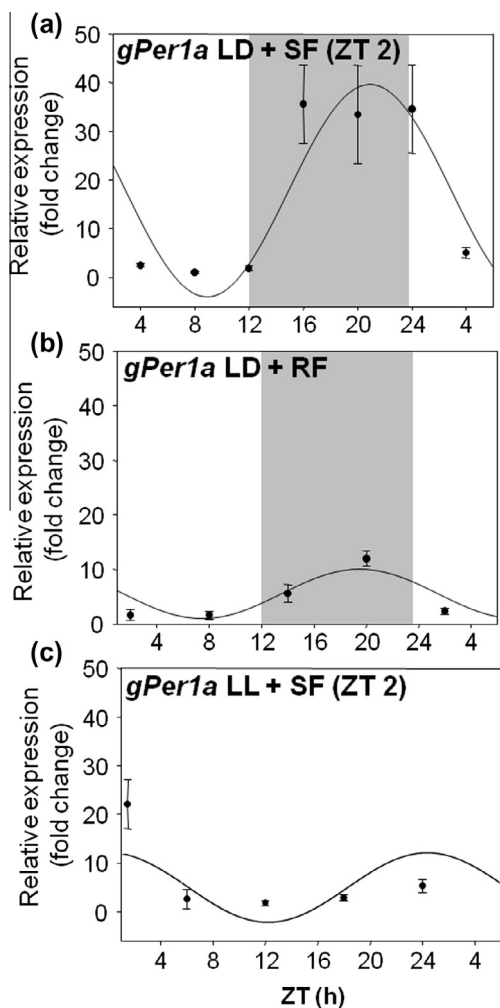
Recent studies suggest a relationship between ghrelin and the circadian system in mammals. Ghrelin would act as a promoting factor in the generation of the food anticipatory activity, and as a regulator of clock genes expression (LeSauter et al., 2009; Yannielli et al., 2007). In goldfish liver, ghrelin induces the expression of three genes from the Period family (Nisembaum et al., 2014a; Fig. 3). This effect seems to be mediated by specific receptors (GHS-R1a1 and GHS-R1a2) highly expressed in the liver (Kaiya et al., 2010), since *Per* induction is blocked by a ghrelin antagonist (Nisembaum et al., 2014a). Ghrelin also induces the hypothalamic expression of *gPer1a* and *gPer3* at 1-h post-injection (Nisembaum et al., 2014a), showing that this hormone is able to act at different levels of the circadian system, and it is a potential candidate as a connecting signal among oscillators.

Orexin is another feeding related peptide also involved in the sleep-wakefulness rhythm. The presence of this neuropeptide in the mammalian suprachiasmatic nucleus (Deurveilher and



**Fig. 1.** Comparative orthology of clock genes in mammals and fish. The figure resumes the current information available on the presence of clock genes (*Per*, *Cry*, *Bmal* and *Clock/Npas2* families) in teleosts and mammals, and suggests the possible gene orthology. Continuous black arrows indicate orthology. Discontinuous arrows indicate teleost-specific genome duplication (3R hypothesis). The underlined genes have been partially cloned in goldfish. Genes in grey have been lost in the groups indicated in balloons. Parentheses ( ) indicate alternative names for some genes. Genes in black and not underlined have not been cloned in goldfish yet, but their presence is presumed. Databases GeneBank and Ensembl were used as main source of published sequences. Tools used were: blast (included in GeneBank and Ensembl web sites) for searching homologs, and ClustalX ver. 2.1 (NJ method) in order to verify orthology. When the nucleotide sequence was the only available, it was translated with the help of Wise2 tool ([www.ebi.ac.uk/Tools/Wise2/advanced.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/Wise2/advanced.html)). Fish taxons referred in the balloons include the species with the more complete knowledge of their genome: Cyprinidae (*Danio rerio*, *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*, *Pimephales promelas*) Otophysi (*Astyanax mexicanus*, *Ictalurus punctatus* plus Cyprinidae). Percomorpha (*Xiphophorus maculatus*, *Oryzias latipes*, *Gasterosteus aculeatus*, *Poecilia formosa*, *Oreochromis niloticus*, *Maylandia zebra*, *Pundamilia nyererei*, *Neolamprologus brichardi*, *Haplochromis burtoni*, *Takifugu rubripes*, *Tetraodon nigroviridis*). Neoteleostei (*Gadus morhua* plus *Percomorpha*). Actinopterygii (*Lepisosteus oculatus*, *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*, *Esox lucius* plus *Otophysi* and *Neoteleostei*).





**Fig. 2.** Daily rhythms of *gPer1a* relative expression in liver of goldfish under different environmental conditions. (A) Goldfish maintained under 12L:12D and scheduled fed at ZT 2. (B) Goldfish maintained under 12L:12D and randomly fed (RF). (C) Goldfish maintained under LL and scheduled fed at ZT 2. Samples were obtained in 4-h intervals (A) or 6-h intervals (B and C) through a 24 h daily cycle. The ZT 0 was defined as the time of the lights on in A and B, and as the last meal time in C. Data obtained by Real Time qRT-PCR are shown as the mean  $\pm$  SEM in relative units ( $\Delta\Delta Ct$  method). The black line represents the periodic sinusoidal functions ( $p < 0.005$ ). Data from Tinoco et al. (2014); and unpublished own results.

	GHRELIN <sup>1</sup> (IP)	OREXIN <sup>2</sup> (ICV)	CORTISOL <sup>3</sup> (IP)	DEXAMETHASONE <sup>3</sup> (in vitro)
<i>gPer1a</i>	↑	=	↑	↑
<i>gPer1b</i>	-	-	↑	↑
<i>gPer2a</i>	↑	=	=	-
<i>gPer3</i>	↑	↓	-	-

**Fig. 3.** Effects of some inputs on clock genes expression in the hepatic oscillator of goldfish. ↑, gene expression induction; ↓, gene expression reduction; =, no changes in expression detected; -, no data available; IP, intraperitoneal injection; ICV, intracerebroventricular injection. (1) Data from Nisembaum et al. (2014a); (2) data from Nisembaum et al. (2014b); (3) unpublished own results.

Semba, 2005) suggests a hypothetical relationship with the circadian system. In goldfish liver, an acute injection of orexin-A produces a small decrease in *gPer3* expression, while induces *gPer1a*, *gPer2* and *gPer3* genes in the hypothalamus and the foregut

(Nisembaum et al., 2014b; Fig. 3), suggesting that liver does not seem to be an important target in a putative temporal signal performed by orexin in goldfish.

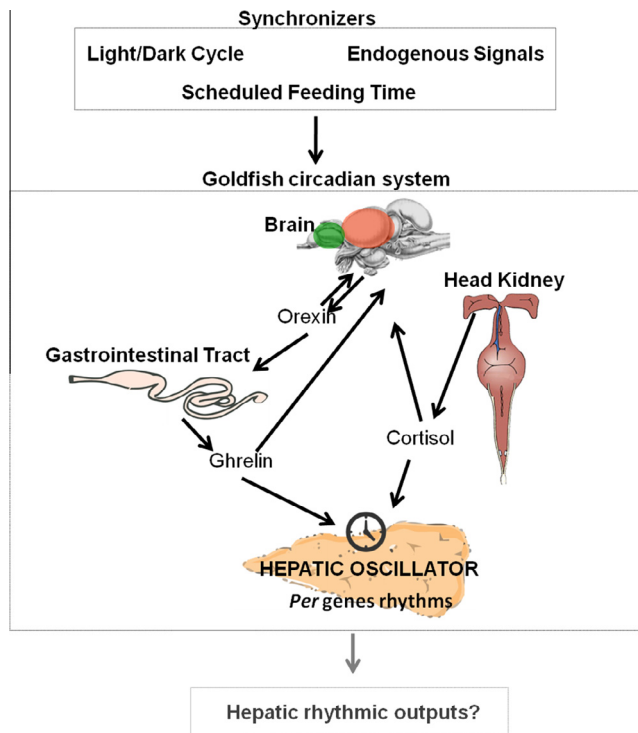
Glucocorticoids are mainly related to metabolism and the stress response (Aluru and Vijayan, 2007). The circulating levels of these hormones show a strong circadian rhythm in vertebrates, that seems to be driven by central and peripheral oscillators (Kalsbeek et al., 2012; Nader et al., 2010). Nevertheless, daily fluctuations in glucocorticoids have been suggested also as an input to the circadian system. In this sense, glucocorticoids modify the circadian genes expression in some mammalian peripheral tissues, as liver, heart, lung, stomach and kidney (Balsalobre et al., 2000; Yamamoto et al., 2005). In goldfish, an acute injection of cortisol, at doses lower than circulating cortisol in stressful conditions (1  $\mu$ g/g) modified *gPer1a* and *gPer1b* expression at 2-h post-injection in the liver (own data presented in the XIII Congress of the European Biological Rhythms Society; Fig. 3). This result suggests that glucocorticoids are modulators of the circadian system even in non-stressful situations, and indicates the high sensitivity of the hepatic oscillator to the glucocorticoid input. Different *in vitro* approaches show a direct effect of glucocorticoids inducing *Per1* expression in the goldfish hepatic clock, since either cortisol or dexamethasone (a glucocorticoid analog) stimulates (4-fold) *Per1a* and *gPer1b* expression (own data presented in the XIII Congress of the European Biological Rhythms Society; Fig. 3). The presence of glucocorticoid receptors in goldfish liver (Aluru and Vijayan, 2007) supports such direct effect. Results obtained in goldfish are in accordance with previous reports in mammals, in which an acute stress exposure and an injection with dexamethasone induced a similar effect on *Per1* expression (Yamamoto et al., 2005).

The physiological relevance of *Per* induction by different hormones is still not well understand. Hypothetically, changes in the transcripts abundance of any of the genes of the molecular core might alter the clockwork. In fact, this is the mechanism underlying synchronization of oscillators by classical zeitgebers (it is well known that light induction of *Per2* in fish leads to a LD cycle synchronization, Vatin et al., 2011). Similarly, endogenous signaling that increase *Per1a* (orexin, ghrelin, cortisol) could shift clock genes expression, and then modify responses to ulterior inputs. Interestingly, *Period* family seems to be the most sensitive target to different signals in the molecular hepatic oscillator, as far as all the hormones studied to date in goldfish modifies *Period* transcripts (Fig. 3; Nisembaum et al., 2014a; own data presented in the XIII Congress of the European Biological Rhythms Society). In mammals, *Per1* has different regulator elements on its promoter (CRE, E-box, GRE sequences; Vatin et al., 2011; Yamamoto et al., 2005), that supports their high sensitivity to different signals, and point out that *Per* genes family plays a key role integrating environmental and endogenous signals in the circadian system functional organization in fish. This agrees with the suggested mechanism for circadian synchronization to different environmental cues in mammals (Albrecht, 2012), and raises the question of two different types of oscillators, the light entrained oscillators and food entrained oscillators.

#### 4. Concluding remarks

In overall, we can conclude that the goldfish hepatic oscillator is regulated differentially by photic and non-photoc cues that work together to ensure the correct functioning of the clock in the liver (Fig. 4). This crosstalking between metabolic signals and the circadian system makes sense, as liver is one of the most important tissues linked to metabolism (Schmutz et al., 2012), and justifies why this oscillator is more sensitive to feeding inputs than central





**Fig. 4.** Input signals to the hepatic oscillator. As an element of a complex circadian net, the liver of the goldfish receives inputs, possesses the molecular clockwork machinery and probably drives outputs or overt rhythms. The daily rhythmic expression of *gPer1a* in this organ is driven by both environmental zeitgebers, light–dark cycle and feeding time. Abundance of *Per* genes in the liver can be also modulated by ghrelin (Nisembaum et al., 2014a) and glucocorticoids (unpublished own results), suggesting that these hormones could be involved in the crosstalking among different oscillators. Orexin seems to induce *per* expression in the brain and in the gut, but not in the liver, (Nisembaum et al., 2014b). Continuous black lines indicate the hormones that modify clock gene expression (from *per* family) in the corresponding tissue. For more details see the text. At present, it remains to be determined which other genes are targets for the studied hormones, other putative entraining signals (as the nervous system), or how the animal integrates all this information to finally generate an output.

ones. Moreover, reviewed data support an important role for hormonal signaling in the goldfish circadian network, allowing the crosstalking among oscillators.

## Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## Acknowledgments

This study was supported by funds from the Spanish MINECO, AGL2013-46448-C3-2R. A. Sánchez-Bretaño is a predoctoral fellow from Spanish MINECO.

## References

Albrecht, U., 2012. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 74, 246–260.  
Aluru, N., Vijayan, M.M., 2007. Hepatic transcriptome response to glucocorticoid receptor activation in rainbow trout. *Physiol. Genomics* 31, 483–491.  
Aranda, A., Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J., 2001. Influence of light on feeding anticipatory activity in goldfish. *J. Biol. Rhythms* 16, 50–57.  
Azpeleta, C., Sánchez-Bretaño, A., Isorna, E., Nisembaum, L.G., Velarde, E., de Pedro, N., 2012. Understanding the circadian system as a net of clocks: daily expression of clock genes in the hypothalamus–pituitary–adrenal axis in *Carassius auratus*. In: Delgado, M.J., Alonso-Gómez, A.L., de Pedro, N., Isorna, E.

(Eds.), *Avances en Endocrinología Comparada*. Servicio de Publicaciones de la Universidad Complutense de Madrid, Madrid, pp. 37–40.  
Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Schütz, G., Schibler, U., 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344–2347.  
Cavallari, N., Frigato, E., Vallone, D., Fröhlich, N., Lopez-Olmeda, J.F., Foà, A., Berti, R., Sánchez-Vázquez, F.J., Bertolucci, C., Foulkes, N.S., 2011. A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *PLoS Biol.* 9, e1001142.  
Davie, A., Minghetti, M., Migaud, H., 2009. Seasonal variations in clock-gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Chronobiol. Int.* 26, 379–395.  
Deurveilher, S., Semba, K., 2005. Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience* 130, 165–183.  
Feliciano, A., Vivas, Y., de Pedro, N., Delgado, M.J., Velarde, E., Isorna, E., 2011. Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J. Biol. Rhythms* 26, 24–33.  
Kaiya, H., Miura, T., Matsuda, K., Miyazato, M., Kangawa, K., 2010. Two functional growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) type 1a and 2a in goldfish, *Carassius auratus*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 327, 25–39.  
Kalsbeek, A., van der Spek, R., Lei, J., Ender, E., Buijs, R.M., Fliers, E., 2012. Circadian rhythms in the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 349, 20–29.  
Kornmann, B., Schaad, O., Reinke, H., Saini, C., Schibler, U., 2007. Regulation of circadian gene expression in liver by systemic signals and hepatocyte oscillators. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 319–330.  
LeSauter, J., Hoque, N., Weintraub, M., Pfaff, D.W., Silver, R., 2009. Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13582–13587.  
Martín-Robles, A.J., Isorna, E., Whitmore, D., Muñoz-Cueto, J.A., Pendón, C., 2011. The clock gene *Period3* in the nocturnal flatfish *Solea senegalensis*: molecular cloning, tissue expression and daily rhythms in central areas. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 159, 7–15.  
Mazurais, D., Le Dréan, G., Brierley, I., Anglade, I., Bromage, N., Williams, L.M., Kah, O., 2000. Expression of clock gene in the brain of rainbow trout: comparison with the distribution of melatonin receptors. *J. Comp. Neurol.* 422, 612–620.  
Meyer, A., Scharf, M., 1999. Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (–to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 699–704.  
Moore, H.A., Whitmore, D., 2014. Circadian rhythmicity and light sensitivity of the zebrafish brain. *PLoS ONE* 9, e86176.  
Nader, N., Chrousos, G.P., Kino, T., 2010. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 277–286.  
Nisembaum, L.G., de Pedro, N., Delgado, M.J., Isorna, E., 2014a. Crosstalk between the “gut–brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 205, 287–295.  
Nisembaum, L.G., de Pedro, N., Delgado, M.J., Sánchez-Bretaño, A., Isorna, E., 2014b. Orexin as an input of circadian system in goldfish: effects on clock gene expression and locomotor activity rhythms. *Peptides* 52, 29–37.  
Sánchez, J.A., Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J., 2010. Molecular cloning, tissue distribution, and daily rhythms of expression of *per1* gene in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Chronobiol. Int.* 27, 19–33.  
Schmutz, I., Albrecht, U., Ripperger, J.A., 2012. The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Mol. Cell. Endocrinol.* 349, 38–44.  
Stokkan, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., 2001. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291, 490–493.  
Tinoco, A.B., Nisembaum, L.G., de Pedro, N., Delgado, M.J., Isorna, E., 2014. Leptin expression is rhythmic in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). Role of feeding time. *Gen. Comp. Endocrinol.* 204, 239–247.  
Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., Foulkes, N.S., 2011. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett.* 585, 1485–1494.  
Velarde, E., Haque, R., Iuvone, P.M., Azpeleta, C., Alonso-Gómez, A.L., Delgado, M.J., 2009. Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of period and cryptochrome transcripts in retina, liver, and gut. *J. Biol. Rhythms* 24, 104–113.  
Vera, L.M., Negrini, P., Zagatti, C., Frigato, E., Sánchez-Vázquez, F.J., Bertolucci, C., 2013. Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*). *Chronobiol. Int.* 30, 649–661.  
Wang, H., 2008. Comparative analysis of period genes in teleost fish genomes. *J. Mol. Evol.* 67, 29–40.  
Watanabe, N., Itoh, K., Mogi, M., Fujinami, Y., Shimizu, D., Hashimoto, H., Uji, S., Yokoi, H., Suzuki, T., 2012. Circadian pacemaker in the suprachiasmatic nuclei of teleost fish revealed by rhythmic *period2* expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 178, 400–407.  
Weger, M., Weger, B.D., Diotel, N., Rastegar, S., Hirota, T., Kay, S.A., Strähle, U., Dickmeis, T., 2013. Real-time in vivo monitoring of circadian E-box enhancer activity: a robust and sensitive zebrafish reporter line for developmental, chemical and neural biology of the circadian clock. *Dev. Biol.* 380, 259–273.  
Yamamoto, T., Nakahata, Y., Tanaka, M., Yoshida, M., Soma, H., Shinohara, K., Yasuda, A., Mamme, T., Takumi, T., 2005. Acute physical stress elevates mouse *period1* mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J. Biol. Chem.* 280, 42036–42043.  
Yannielli, P.C., Molyneux, P.C., Harrington, M.E., Golombek, D.A., 2007. Ghrelin effects on the circadian system of mice. *J. Neurosci.* 27, 2890–2895.

# DISCUSIÓN

## 1. Anatomía del sistema circadiano del carpín

- Distribución anatómica de osciladores y del sistema ghrelinérgico del carpín.
- Regiones relacionadas con la detección de luz.
- Regiones relacionadas con sistemas de regulación de la ingesta y balance energético.

## 2. El sistema circadiano del carpín como una red de osciladores: importancia de la comunicación hormonal.

## 3. El hígado del carpín como oscilador

- Ghrelina como señal moduladora del sistema circadiano del carpín. Importancia de la ingesta en la regulación circadiana.
- Glucocorticoides como señales sincronizadoras del sistema circadiano del carpín. Posible efecto del estrés en la regulación circadiana.
- Regulación multihormonal del oscilador hepático del carpín.

## 4. Diferente sensibilidad de los genes reloj en el sistema circadiano del carpín. La familia *per* como entrada de señales al sistema circadiano.

## 5. Observaciones finales





## 1. ANATOMÍA DEL SISTEMA CIRCADIANO DEL CARPÍN

En el primer capítulo de la presente Tesis Doctoral se estudia por primera vez en carpín la organización anatómica del sistema circadiano mediante el análisis de la presencia del ARNm del gen reloj *gper1b* a través de la técnica de hibridación *in situ*. Igualmente, se analiza la distribución anatómica de uno de los pocos sistemas hormonales relacionados, hasta la realización de la presente Tesis, con la regulación de los genes reloj en el carpín, el sistema ghrelinérgico (Nisembaum et al., 2014b).

### Distribución anatómica de osciladores y del sistema ghrelinérgico del carpín

El primer paso para el estudio de la distribución anatómica de los osciladores consistió en el clonaje de una secuencia parcial del gen reloj *gper1b*. La evolución de los peces teleósteos incluyó un fenómeno de duplicación génica que provocó la aparición de copias extra de los genes reloj en los teleósteos en comparación con el número de estos mismos genes en mamíferos (Wang, 2008a; Wang, 2008b; Wang, 2009). En algunos casos, alguna de las copias ha sido perdida a lo largo de la evolución mientras que en otros ambas copias permanecen y pueden bien mantener funciones similares, formando mecanismos redundantes para asegurar la realización correcta de dicha función o bien especializarse en funciones diferentes. En el caso de los genes de la familia *per*, y más concretamente, en el caso de las copias del gen *per1*, la copia más conservada en todos los grupos de teleósteos es *per1b*, mientras que en el caso de *per1a*, en algunas especies concretas ha desaparecido a lo largo de la evolución (resultados presentados en el capítulo 3.3; Wang, 2008b). Concretamente en el carpín, el gen *gper1a* fue clonado con anterioridad y se demostró su funcionalidad como gen reloj en diversas localizaciones encefálicas y extra-encefálicas mediante estudios de PCR (Velarde et al., 2009). Sin embargo, hasta la fecha, no se había descrito la presencia de la copia más común en teleósteos en el genoma del carpín dorado. Tras la obtención de la secuencia parcial del ARNm de *gper1b*, se procedió en primer lugar a su estudio a nivel anatómico mediante la técnica de hibridación *in situ* (resultados que serán discutidos en el presente apartado) y, posteriormente, se estudió su funcionalidad entendida como su capacidad de presentar una expresión rítmica (resultados discutidos en el apartado 2 de la presente discusión general).

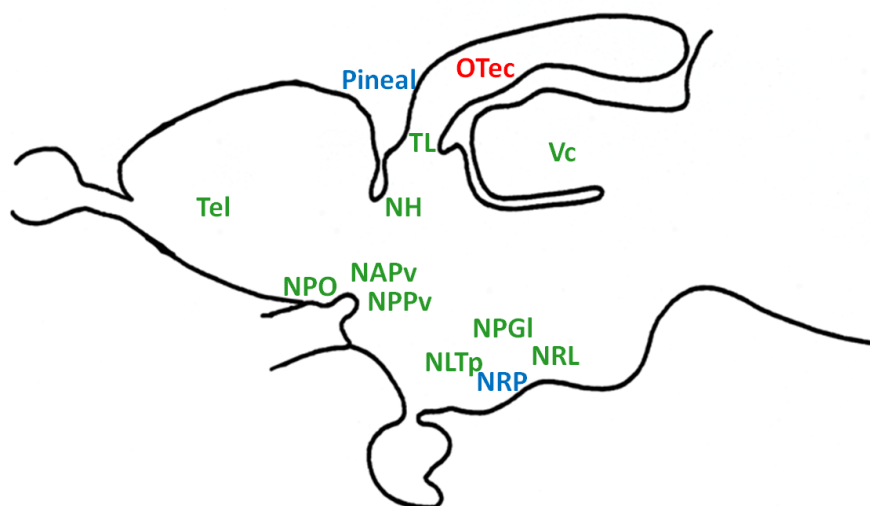
Los resultados obtenidos (capítulo 1.1) apoyan la existencia de la maquinaria de los osciladores en multitud de localizaciones tanto centrales como periféricas (hipófisis, intestino anterior e hígado) en carpín dorado, como se había descrito previamente mediante análisis de PCR en tiempo real (Nisembaum et al., 2012; Velarde et al., 2009). Concretamente, la

distribución anatómica observada en el cerebro del carpín para el gen reloj *gper1b* (Figura D1) coincide con la previamente descrita para el pez cebra (Weger et al., 2013) destacando su presencia en el núcleo anterior periventricular, homólogo al NSQ de mamíferos. Además, en muchos casos, los núcleos que presentan expresión de *gper1b* han sido previamente relacionados en teleósteos con señales sincronizadoras como los ritmos de luz-oscuridad (núcleos fotosensibles o directamente conectados con áreas fotosensibles) o de ingesta-ayuno (núcleos donde se expresan componentes de sistemas reguladores de la ingesta y del balance energético como la orexina o el NPY), tema que se aborda en los puntos siguientes de la presente Discusión General de la Tesis.

Entre todos los sistemas hormonales relacionados con el sistema circadiano, en la presente Tesis Doctoral se ha estudiado en profundidad la distribución anatómica del sistema ghrelinérgico como un posible nexo de unión entre la regulación de la ingesta y el balance energético y el sistema circadiano de los peces teleósteos (capítulo 1.2). En este sentido, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la presencia del transcrito del receptor de ghrelina, *ghs-r1a*, en múltiples localizaciones tanto encefálicas como extra-encefálicas coincidentes con la presencia del ARNm del gen reloj *gper1b*, entre las que se pueden destacar diferentes áreas del hipotálamo (Figura D1). Esta distribución es, además, bastante similar a la descrita previamente para el mismo tipo de receptor en otro teleósteo, el mero de pintas naranjas (*Epinephelus coioides*; Chen et al., 2008) y en mamíferos (Guan et al., 1997; Zigman et al., 2006). Si bien no es sorprendente el hecho de detectar expresión de receptores de ghrelina en multitud de núcleos hipotalámicos dada su importante función como señal reguladora de la ingesta y del balance energético en los vertebrados y la relevancia del hipotálamo como centro regulador endocrino (Berthoud, 2002; Luiten et al., 1987; Saper y Lowell, 2014), es interesante el hecho de que en estas mismas localizaciones se haya encontrado maquinaria molecular del sistema circadiano. Igualmente, es sorprendente la detección de receptores de ghrelina en localizaciones que *a priori* no parecen relacionadas de manera directa con la regulación de la ingesta o del balance energético del organismo pero que igualmente coinciden con áreas donde se detectó expresión del gen reloj *gper1b*. Así, se podría sugerir inicialmente que, al menos en lo que respecta a la anatomía del sistema circadiano (*per1b*) y el sistema ghrelinérgico, existe una relación entre ambos. Si bien se intentaron realizar colocalizaciones de ambos, éstas no fueron posibles finalmente por problemas metodológicos. Sin embargo, se puede afirmar que en la mayor parte de las localizaciones donde se detectó el gen reloj, se encontró igualmente presencia del receptor de ghrelina (Figura D1).

Con respecto a la propia ghrelina, si bien clásicamente se consideró el tracto gastrointestinal como su principal lugar de síntesis en vertebrados, posteriormente se ha propuesto la posible síntesis de dicha hormona a nivel hipotalámico, lo que no sería extraño por su importante papel en la regulación de la ingesta y el balance energético. Estos estudios más detallados han detectado la presencia de la *preproghrelina* en mamíferos a nivel central en determinados núcleos hipotalámicos donde abundan neuronas que expresan NPY/AgRP y pro-opiomelanocortina (POMC) (Cowley et al., 2003; Ferrini et al., 2009; Guan et al., 2003; Guan et al., 2008; Hori et al., 2008; Hou et al., 2006; Lu et al., 2002; Sato et al., 2005), aunque su abundancia es muy inferior a la observada a nivel gastrointestinal. Esta situación se observa igualmente en determinados teleósteos (Kaiya et al., 2003; Kaiya et al., 2005; Terova et al., 2008) donde existe presencia de transcritos de ghrelina en el hipotálamo u otras regiones del encéfalo en bajas cantidades. Concretamente, en el caso del carpín, los resultados de la presente Tesis Doctoral muestran la existencia, en efecto, de expresión de *preproghrelina* en el encéfalo y el hipotálamo por PCR en tiempo real que indican una posible síntesis a nivel local de ghrelina, aunque al no encontrarse transcritos de ghrelina por hibridación *in situ* podría suponerse que esta síntesis central de ghrelina parece escasa. De hecho, en este sentido, el laboratorio del Dr. Unniappan fue capaz de detectar pequeños niveles de ghrelina en el hipotálamo de carpín por hibridación *in situ* (Kerbel y Unniappan, 2012). El bajo nivel de síntesis de ghrelina a nivel hipotalámico se ha relacionado con una acción a nivel local estimulando las neuronas NPY/AgRP para la estimulación del apetito. Igualmente, en mamíferos se ha descrito un posible papel de esta ghrelina hipotalámica como regulador de determinadas hormonas hipofisarias como la TSH, la ACTH y la GH (Cowley et al., 2003; Kamegai et al., 2000; Nakazato et al., 2001; Wren et al., 2000).

Es importante resaltar que, en el caso de la glándula pineal, uno de los osciladores endógenos mejor conocidos y descritos en vertebrados y, en concreto, en peces teleósteos (Ekström y Meissl, 1997; Falcón, 1999; Falcón et al., 2010), no se pudo obtener tejido viable para el estudio del gen reloj *gper1b* y es por esa razón que no aparece colocalizado con el receptor de ghrelina cuya presencia en la glándula pineal se demuestra en la presente Tesis (Figura D1). Así pues, aunque no se haya localizado anatómicamente en la presente Tesis Doctoral la presencia de genes reloj en la glándula pineal del carpín, se puede afirmar con alto grado de certeza que en esta localización se esperaría encontrar ambos, *gper1b* y el receptor de ghrelina.



**Figura D1.** Esquema de la distribución anatómica del transcrito del gen reloj, *gper1b* (rojo), del ARNm del receptor de ghrelina, *ghs-r1a* (azul), y de ambos (verde) en el encéfalo del carpín. OTec, techo óptico; NAPv, núcleo anterior periventricular; NH, núcleos habenules; NLTP, parte posterior del núcleo lateral tuberal; NPGI, parte lateral del núcleo preglomeruloso; NPO, núcleo preóptico; NPPv, núcleo posterior periventricular; NRL, núcleo del receso lateral; NRP, núcleo del receso posterior; Tel, telencéfalo; TL, *torus longitudinalis*; Vc, válvula del cerebelo. Realizado a partir de los datos obtenidos en el capítulo 1 de la presente Tesis.

En general el conocimiento de la localización anatómica de la maquinaria molecular de los osciladores endógenos en vertebrados se encuentra bastante restringido a estudios realizados en cerebro (Abe et al., 2002; Amir et al., 2004; García-Fernández et al., 2007; Gerstner et al., 2006; Girotti et al., 2009; Namihira et al., 1999; Shieh et al., 2005; Wakamatsu et al., 2001). Sin embargo, a pesar de que en la actualidad se reconoce al sistema circadiano de los vertebrados como a una red de nodos localizados en el organismo en su totalidad que están intercomunicados y coordinados entre sí, no son muchos los trabajos que abordan el estudio de la localización anatómica de los genes reloj en localizaciones periféricas (Fahrenkrug et al., 2006; Girotti et al., 2009; Sládek et al., 2007; Weger et al., 2013).

En el estudio anatómico de la localización de los nodos del sistema circadiano del carpín realizado en la presente Tesis Doctoral se ha demostrado igualmente la presencia de la maquinaria molecular necesaria para la presencia de osciladores funcionales en áreas extra-encefálicas como la hipófisis, el hígado y el intestino anterior (capítulo 1.1). La hipófisis ha sido ampliamente estudiada como uno de los osciladores del sistema circadiano de vertebrados, demostrándose la presencia de ritmos autosostenidos de expresión de los genes reloj en explantes de hipófisis de roedores mantenidos en cultivo (Abe et al., 2002; Becquet et al., 2014; Chu et al., 2013; Yoo et al., 2004). De hecho, se ha demostrado la ritmicidad endógena circadiana y estacional de multitud de hormonas hipofisarias tanto en

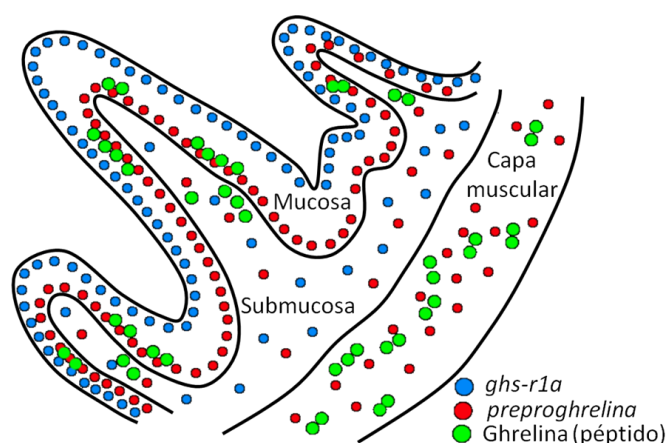
mamíferos a nivel de cultivo o de estudios *in vivo* (Becquet et al., 2014; Bertram et al., 2010; Lincoln et al., 2003) como en otros vertebrados incluyendo los teleósteos (Ayson y Takemura, 2006; Batten y Ball, 1976; López-Olmeda et al., 2013; Rodríguez-Illamola et al., 2011), incluso existen estudios en el carpín (Hontela y Peter, 1983; Leatherland y McKeown, 1973; McKeown y Peter, 1976). Además, a pesar del conocimiento previo de la presencia de genes reloj mediante estudios de PCR, esta es la primera evidencia anatómica (mediante hibridación *in situ*) que muestra la existencia de un oscilador hipofisario en teleósteos. Los transcritos de *gper1b* en esta localización presentan una distribución amplia, apareciendo en casi la totalidad de las células, tanto de la *pars distalis* como de la *pars intermedia*, de acuerdo con la información existente sobre mamíferos donde se ha demostrado la presencia de genes reloj en prácticamente todos los tipos celulares hipofisarios (Lin et al., 2015). No obstante, sería especialmente interesante continuar estudiando los tipos celulares que expresan genes reloj en la hipófisis del carpín mediante análisis de colocalizaciones con los marcadores específicos de cada tipo celular hipofisario. Sin duda, este conocimiento sería de gran utilidad a la hora de conocer los mecanismos de comunicación y de coordinación del sistema circadiano de los peces teleósteos, especialmente para el conocimiento de la relación entre el sistema endocrino y el circadiano.

Con respecto a la presencia del ARNm de *gper1b* en el hígado y el intestino anterior del carpín, datos previos de nuestro grupo de investigación ponen de manifiesto la expresión de diferentes genes reloj en estas localizaciones mediante análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (Feliciano et al., 2011; Nisembaum et al., 2012; Tinoco et al., 2014; Velarde et al., 2009). Los resultados de la presente Tesis Doctoral confirman la existencia de genes reloj en estas localizaciones y profundizan en la localización tisular de dichos genes. Concretamente, se observa la presencia de transcritos de *gper1b* en la mayoría de las células presentes en el tejido hepático así como en todas las capas del intestino anterior (mucosa, submucosa y capa muscular). Si bien este es el primer estudio anatómico de distribución de genes reloj en el hígado de un vertebrado, por su parte, en el caso del intestino, un estudio previo en colon de rata indica la expresión de genes reloj con mayor abundancia en la capa mucosa como sucede en el caso del carpín (Sládek et al., 2007). Al igual que en el caso de la hipófisis sería de gran interés conocer los tipos celulares que contienen el oscilador intestinal en peces teleósteos. En este sentido, en mamíferos, se ha detectado expresión de genes reloj a lo largo del tracto gastrointestinal de roedores, con mayor presencia en los enterocitos localizados a nivel de la mucosa, siendo especialmente relevantes en la regulación de la absorción de macronutrientes



(Balakrishnan et al., 2010; Balakrishnan et al., 2012; Hoogerwerf et al., 2007; Pan y Hussain, 2009; Sládek et al., 2007).

En lo que respecta al sistema ghrelinérgico en tejidos periféricos (capítulo 1.2), tanto el gen de la *preproghrelina* como el propio péptido se localizan en todas las capas del tracto gastrointestinal proximal en el carpín, lo que confirma a esta región como el principal lugar de síntesis de la ghrelina en carpín como se ha descrito de manera general en otros vertebrados (Date et al., 2000; Kojima et al., 1999; Neglia et al., 2005; Rindi et al., 2002; Sakata et al., 2010; Vitari et al., 2012; Zhao et al., 2007) incluyendo teleósteos (Arcamone et al., 2009; Breves et al., 2009; Kaiya et al., 2003c; Kaiya et al., 2008; Miura et al., 2009; Murashita et al., 2009; Terova et al., 2008; Unniappan y Peter, 2005).



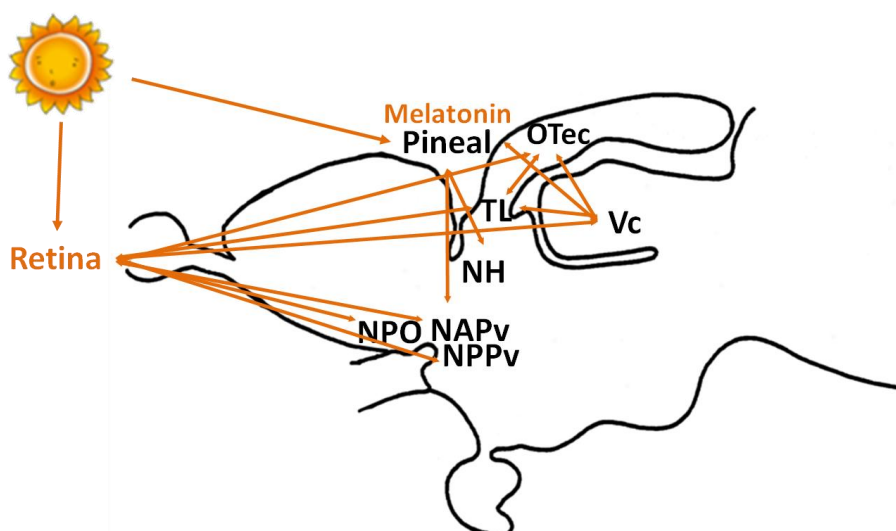
**Figura D2.** Esquema que indica la distribución anatómica del sistema ghrelinérgico en las diferentes capas del intestino proximal del carpín dorado (mucosa, submucosa y capa muscular). Distribución del ARNm del receptor de ghrelina, *ghs-r1a* (azul), el transcrito de *preproghrelina* (rojo) y el propio péptido (verde) en el intestino proximal incluyendo esófago, bulbo intestinal, bucle en “J” e intestino anterior. Realizado a partir de los datos obtenidos en el capítulo 1 de la presente Tesis.

Igualmente, en la presente Tesis Doctoral, se presenta por primera vez en teleósteos la distribución anatómica del receptor GHS-R1a en tracto gastrointestinal, demostrando su expresión en las capas mucosa y submucosa de las diferentes regiones del intestino proximal (incluyendo el esófago, el bulbo intestinal, el bucle en “J” y el intestino anterior; Figura D2). Es interesante destacar el hecho de que el ARNm del receptor de ghrelina, *ghs-r1a*, presenta una localización apical en las células de la mucosa mientras que la propia ghrelina aparece en capas más basales y cercanas a la submucosa. El único estudio con el que se pueda contrastar la localización anatómica de dichos receptores en teleósteos fue realizado en pez cebra (Olsson et al., 2008), donde se observó gran cantidad de receptores de ghrelina en las células

endocrinas de la mucosa intestinal así como en la capa muscular, que se relacionaron con la acción de la ghrelina como modulador de la motilidad intestinal en este teleósteo. El caso de que en el carpín no parezca haber receptores de ghrelina en esta capa muscular intestinal (con la única excepción del esófago) parece estar en consonancia con el hecho de que en el caso del carpín no se haya detectado ningún efecto de la ghrelina sobre la motilidad intestinal (Kitazawa et al., 2012).

### Regiones relacionadas con la detección de luz.

De todas las posibles señales rítmicas del ambiente interno y externo al que están sometidos los seres vivos, la alternancia entre el día y la noche podría ser considerada como una de las más relevantes a la hora de establecer una necesidad evolutiva de anticiparse a estos cambios. La presencia o ausencia de luz hacen imprescindible la adaptación de los seres vivos a dos entornos diferentes alternantes dentro de cada ciclo de 24 horas. En este sentido, no resulta sorprendente la presencia de osciladores endógenos en localizaciones directamente relacionadas con las áreas encargadas de la detección de la luz en el encéfalo. Si bien en la presente Tesis Doctoral no se realizó el análisis anatómico de la retina y, en el caso del estudio de la localización del gen reloj *gper1b* no fue posible la obtención de resultados con respecto a la glándula pineal, muchas de las localizaciones encefálicas estudiadas donde se encontraron transcritos del gen reloj *gper1b* y del receptor de ghrelina *ghs-r1a* coinciden con estructuras fotosensibles, como es el caso del receptor de ghrelina presente en la glándula pineal; o con áreas directamente conectadas con éstas estructuras fotosensibles (figura D3).



**Figura D3.** Núcleos cerebrales fotosensibles o directamente conectados con áreas fotosensibles en teleósteos que presentan señal de transcritos de *gper1b* y *ghs-r1a* en el carpín. NAPv, núcleo anterior periventricular; NH, núcleos habenules; NPO, núcleo preóptico; NPPv, núcleo preóptico periventricular; OTec, techo óptico; TL, *torus longitudinalis*;

Vc, válvula del cerebelo. Relación entre los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral y los datos preexistentes de las áreas fotosensibles o en contacto con éstas en teleósteos.

Como puede observarse en la figura D3, existe un entramado de núcleos encefálicos en el carpín que presentan transcritos del gen reloj *gper1b* y que han sido previamente relacionados en diferentes teleósteos con la transducción de la información lumínica del ambiente, lo que podría suponer la posibilidad de que estas regiones formen parte de los denominados “osciladores sincronizables por la luz” (LEOs). Asimismo, el hecho de que estos núcleos presenten expresión de receptores de ghrelina podría estar implicando una posible relación entre los osciladores que forman parte del LEO con la información procedente de la situación energética del organismo transducida por hormonas como la ghrelina. Esto demostraría la cooperación de ambas señales para la sincronización fina del sistema circadiano a señales rítmicas de diferente origen, como previamente se ha sugerido para mamíferos (Blum et al., 2012).

Cabe destacar la presencia de ambos sistemas (circadiano y ghrelinérgico) a nivel hipotalámico. El hipotálamo es considerado una de las localizaciones más relevantes en la organización del sistema circadiano en vertebrados. De hecho, es aquí donde se encuentra el NSQ, responsable de la sincronización de todos los osciladores del organismo en los vertebrados (Bedont y Blackshaw, 2015; Coomans et al., 2015; Moore, 2013; Saini et al., 2011). En este sentido es especialmente relevante el tracto retinohipotalámico encargado de transducir la señal lumínica detectada en la retina directamente a determinados núcleos del hipotálamo. Este tracto ha sido estudiado en profundidad en carpín (Springer y Gaffney, 1981; Springer y Mednick, 1984) e incluye el núcleo preóptico periventricular (NPPv), el núcleo preóptico (NPO) y el núcleo anterior periventricular (NAPv) (Holmqvist et al., 1992) considerado el homólogo en peces teleósteos al NSQ de mamíferos, tres de las localizaciones donde se han encontrado transcritos de *gper1b* y del receptor de ghrelina *ghs-r1a*. Además, algunos de estos núcleos hipotalámicos muestran también expresión de orexina en teleósteos (Facciolo et al., 2010; Facciolo et al., 2012), la denominada “hormona del despertar” (Sutcliffe y de Lecea, 2002), información que se ampliará en el próximo apartado de la presente discusión general.

Por otra parte, se ha detectado presencia de transcritos tanto de *gper1b* como de *ghs-r1a* en las neuronas de los núcleos habenules (capítulos 1.1 y 1.2). En los roedores estas neuronas tienen ritmicidad circadiana en su tasa de disparo, responden a estímulos fóticos (Sakhi et al., 2014; Zhao y Rusak, 2005) y regulan los ritmos de actividad locomotora (Paul et al., 2011; Tavakoli-Nezhad y Schwartz, 2006). Además, muestran ritmicidad diaria de genes

reloj en estos animales (Guilding et al., 2010) y están conectados con la retina y con el NSQ en mamíferos (Kalsbeek et al., 1993; Krout et al., 2002; Qu et al., 1996) y con la pineal de teleósteos (Yáñez et al., 2009). En la habénula de mamíferos se ha detectado además una abundante expresión del receptor de melatonina (la hormona más relacionada con la regulación del sistema circadiano) MT1 (Adamah-Biassi et al., 2014), que es importante en la modulación de los efectos del fotoperiodo sobre los ritmos reproductivos y de comportamiento (Prendergast, 2010). En teleósteos, el primer estudio donde se analizó la posible presencia de ritmos de genes reloj a nivel de la habénula fue realizado en lenguado arenoso (*Paralichthys olivaceus*; Watanabe et al., 2012), donde no se encontraron diferencias día/noche en la expresión del gen *per2* y posteriormente, se analizó esta localización en el pez cebra, donde sí se demostró la oscilación rítmica de los genes reloj (Weger et al., 2013). Igualmente, se ha descrito la conexión de estos núcleos del epítalamo con la glándula pineal en teleósteos (Falcón, 1999), considerada uno de los osciladores circadianos más relevantes y mejor estudiados en estos animales (Falcón, 1999; Falcón et al., 2003; Falcón et al., 2009; Vera et al., 2010).

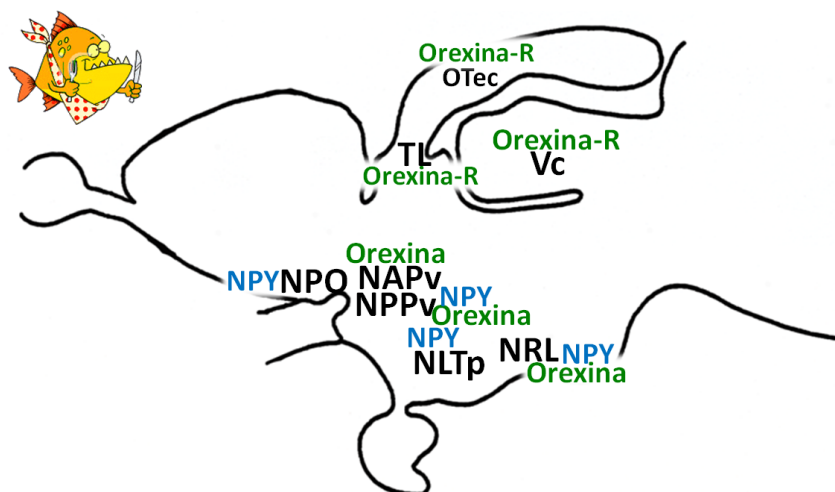
Otras de las áreas encefálicas del carpín donde se ha detectado presencia tanto de *gper1b* como de *ghs-r1a* y que se encuentran directamente comunicadas con zonas sensibles a estímulos fóticos son el torus longitudinalis y el techo óptico, encontrándose en este último además de ritmos del gen reloj *gper1b* (Presente Tesis, capítulo 1.1), ritmos de otros genes reloj (Feliciano et al., 2011). La función principal de estos dos núcleos en el carpín está relacionada con la integración visual (Gibbs y Northmore, 1998; Northmore, 1984; Springer et al., 1977) y el techo óptico en teleósteos a su vez presenta receptores de melatonina (Bayarri et al., 2004b; Ikegami et al., 2009; López Patiño et al., 2008; Mazurais et al., 1999). Igualmente, tanto estas dos áreas como la válvula del cerebelo están intercomunicadas en teleósteos entre sí (Folgueira et al., 2007; Muñoz-Cueto et al., 1998) y con la retina (Folgueira et al., 2007; Yáñez et al., 2009) y, en el caso de la válvula del cerebelo y el techo óptico, también con la glándula pineal (Yáñez et al., 2009). Además de ser áreas relacionadas con zonas fotosensibles, se ha descrito ritmicidad de genes reloj en estas tres localizaciones en pez cebra (Moore y Whitmore, 2014). Por otra parte, estas tres estructuras en teleósteos tienen receptores de orexina (Facciolo et al., 2010; Facciolo et al., 2012), información que se desarrollará en profundidad en el próximo apartado de la presente discusión general.

### **Regiones relacionadas con sistemas de regulación de la ingesta y balance energético.**

Dentro del sistema circadiano de vertebrados, los osciladores sincronizables por el alimento (FEOs) son unos de los principales interrogantes. Esto es así debido a que pese a que desde hace años se describió que la disponibilidad de alimento o el horario restringido de alimentación eran una potente señal sincronizadora de los osciladores moleculares a nivel central y periférico en vertebrados (Bechtold, 2008; Carneiro y Araujo, 2009; Mendoza, 2007; Mistlberger, 2011; Patton y Mistlberger, 2013; Stephan, 2002; Tahara y Shibata, 2013), hasta el momento no se ha podido encontrar un oscilador “maestro” que sea el responsable final de la transducción de la señal “ingesta”, es decir, los ritmos de ingesta-ayuno como sincronizador en ningún grupo de vertebrados.

En la actualidad, se considera como la teoría más sólida la posibilidad de que este oscilador “maestro” esté formado, en realidad, por una red de osciladores trabajando coordinadamente para transducir la señal de disponibilidad de alimento como señal de entrada del sistema circadiano (Bechtold, 2008; Mendoza, 2007; Mistlberger, 2011). Así como los osciladores más implicados en la sincronización al ciclo luz-oscuridad se encuentran en diferentes localizaciones centrales (siendo o estando conectados con estructuras fotorreceptoras), en el caso de la relación entre la regulación de la ingesta, el balance energético y el sistema circadiano, cobran importancia determinados osciladores periféricos como el hipofisario, el hepático y el intestinal (Bechtold, 2008; Mistlberger, 2011).

Por otro lado, según esta teoría, estos osciladores se comunicarían mediante determinadas señales que les permitirían establecer una ritmicidad sincrónica entre los distintos osciladores del organismo. Actualmente se proponen los sistemas orexigénico y anorexigénico como posibles responsables de la transmisión de la información de la situación energética entre los diferentes nodos del sistema circadiano como posibles señales sincronizadoras de ritmos relacionados con el ciclo ayuno-ingesta (Carneiro y Araujo, 2009; Davidson y Stephan, 1999; Mistlberger, 2011; Tinoco et al., 2014). En este sentido, resultados obtenidos como parte del capítulo 2 de la presente Tesis doctoral implican a la ghrelina como una de esas posibles señales hormonales que pueden interactuar con el sistema circadiano del carpín, como se comentará en detalle más adelante en esta discusión general.



**Figura D4. Núcleos cerebrales relacionados con sistemas de regulación de la ingesta y balance energético en teleósteos que presentan señal de transcritos de *gper1b* y *ghs-r1a* en el carpín.** OTec, techo óptico; NAPv, núcleo anterior periventricular; NLTp, parte posterior del núcleo lateral tuberal; NPO, núcleo preóptico; NPPv; núcleo posterior periventricular; NRL, núcleo del receso lateral; TL, *torus longitudinalis*; Vc, válvula del cerebelo. Relación entre los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral y los datos preexistentes de las áreas relacionadas con la ingesta y el balance energético en teleósteos.

Con respecto a la relación entre la ghrelina y el sistema circadiano solamente unos pocos estudios en mamíferos demuestran el posible potencial de esta hormona gastrointestinal como modulador de ritmos de genes reloj y ritmos de salida en mamíferos. Así, esta hormona adelanta la acrofase del gen reloj *Per2* y la actividad eléctrica de las neuronas en explantes de NSQ (Yannielli et al., 2007). Además, es capaz de modular ritmos de actividad locomotora en roedores, si bien depende del régimen alimentario al que estén sometidos (LeSauter et al., 2009; Yannielli et al., 2007). El único estudio en teleósteos ha sido realizado recientemente como parte de una tesis doctoral previa en nuestro grupo de investigación, demostrando que en el carpín, una inyección IP aguda de ghrelina induce la expresión de genes reloj tanto en osciladores centrales como periféricos (Nisembaum et al., 2014b).

En este sentido, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral muestran presencia de transcritos del gen reloj *gper1b* y del receptor de ghrelina, *ghs-r1a*, en ciertos núcleos hipotalámicos previamente relacionados con el balance energético y la regulación de la ingesta en peces teleósteos (figura D4), entre ellos el núcleo preóptico, el núcleo preóptico periventricular, el núcleo anterior periventricular, homólogo al NSQ, el núcleo lateral periventricular y el núcleo del receso lateral. De hecho, estas localizaciones se caracterizan por ser parte de los sistemas orexinérgico (Facciolo et al., 2010; Facciolo et al., 2012) y NPYérgico (Hoskins y Volkoff, 2012; Kah et al., 1989) en peces teleósteos.

Además del hipotálamo, otras localizaciones encefálicas muestran expresión de ambos genes, entre las que destacan el *torus longitudinalis*, el techo óptico y la válvula del cerebelo. Estas tres estructuras, sobre las que previamente se han discutido en relación a la integración de información lumínica, se han relacionado también con sistemas peptidérgicos orexigénicos en el carpín. En este sentido, todas ellas tienen receptores de orexina (Facciolo et al., 2010; Facciolo et al., 2012), hormona que se ha sugerido como posible moduladora del sistema circadiano en esta especie (Nisembaum et al., 2014a). Por otra parte, el techo óptico presenta expresión del gen de NPY (Peng et al., 1994; Vecino et al., 1994) también relacionado con la regulación del sistema circadiano en peces (Sindelar et al., 2005; Weber y Rea, 1997), que muestra a su vez ritmicidad circadiana en el hipotálamo del carpín (Hoskins y Volkoff, 2012) y que es la hormona más relacionada con la acción central de la ghrelina en la regulación de la ingesta (Dickson y Luckman, 1997; Nakazato et al., 2001; Shintani et al., 2001; Tschöp et al., 2002). Todos estos datos apoyan la existencia de osciladores centrales en distintos núcleos, que podrían estar relacionados con los ritmos descritos para distintos reguladores de la ingesta en el carpín, y que serían la constatación anatómica de que el balance energético y el sistema circadiano están relacionados a nivel central.

A nivel periférico, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral ponen de manifiesto la presencia de *gper1b* en la hipófisis, así como de transcritos (*gper1b* y *ghs-r1a*) en hígado y tracto gastrointestinal del carpín pudiendo implicar una comunicación entre ambos sistemas ghrelinérgico y circadiano igualmente a estos niveles.

## **2. EL SISTEMA CIRCADIANO DEL CARPÍN COMO UNA RED DE OSCILADORES: IMPORTANCIA DE LA COMUNICACIÓN HORMONAL.**

Como se ha comentado previamente, en la actualidad, se considera el sistema circadiano de vertebrados como una red de osciladores localizados en todo el organismo (Albrecht, 2012; Dibner et al., 2010; Isorna et al., 2015; Mohawk et al., 2012; Saini et al., 2011).

Como se ha descrito hasta ahora en la presente Tesis Doctoral, la maquinaria molecular necesaria para la presencia de un oscilador en el carpín está presente tanto en localizaciones centrales como periféricas. Pero, ¿son estos supuestos osciladores funcionales en el carpín? Y si es así, ¿cómo se comunican entre ellos?

De forma clásica en peces se ha considerado a la glándula pineal y a la retina, junto con el encéfalo como los elementos principales de la organización del sistema circadiano, no sólo por su carácter endógeno, sino también por su relación directa con la captación de la luz

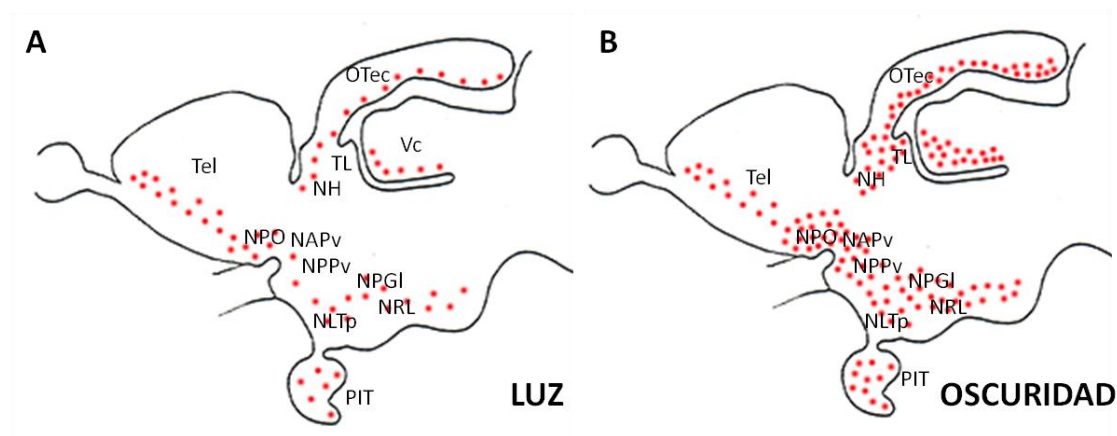
(Falcón, 1999; Falcón et al., 2003; Yáñez et al., 2009). En este sentido, está muy demostrada la importancia de la retina y la glándula pineal como transductores de la información lumínica ambiental para la sincronización de los ritmos diarios de melatonina, que son incluso mantenidos en condiciones *in vitro*, y que es considerada una señal endógena capaz de enviar la información desde ambas localizaciones hasta los diferentes osciladores del organismo (Falcón et al., 2003; Falcón et al., 2009; Falcón et al., 2010). Sin embargo, el descubrimiento de la importancia de los ritmos de ayuno-ingesta para la sincronización de los diferentes nodos del sistema circadiano, así como el descubrimiento de que en el pez cebra todas sus células responden a la presencia/ ausencia de la luz ambiental (Tamai et al., 2005; Whitmore et al., 2000) o el mantenimiento de ritmos autosostenidos de diferentes órganos periféricos en el pez cebra en condiciones *in vitro* (Whitmore et al., 1998) junto con la imposibilidad de encontrar una estructura funcionalmente análoga al NSQ de mamíferos que sea responsable de sincronizar al resto de osciladores (Isorna et al., 2015; Moore y Whitmore, 2014) sugieren una organización del sistema circadiano de teleósteos con una mayor flexibilidad en cuanto a la funcionalidad de los diferentes osciladores y su acción sincronizada.

En este sentido, aceptando que el sistema circadiano en teleósteos, y concretamente en nuestro modelo, el carpín, se organiza como una red de osciladores que han de estar comunicados entre sí (Isorna et al., 2015), en la presente Tesis Doctoral, se ha estudiado la “funcionalidad” de los distintos osciladores, entendida como la existencia de ritmos diarios de genes reloj, para posteriormente averiguar si se sincronizan a las mismas señales, así como si están o no sincronizados entre ellos.

En los resultados obtenidos en el primer capítulo de la presente Tesis Doctoral, más allá del análisis exhaustivo de la distribución anatómica encefálica y periférica de un gen reloj tomado como representativo de la maquinaria molecular, *gper1b*, se ha descrito su patrón de expresión a lo largo de un ciclo de 24 h. Tanto mediante técnicas de imagen como por PCR cuantitativa en tiempo real, los resultados indican que existe una variación diaria de los niveles de transcritos del gen reloj en todas las localizaciones estudiadas (cerebro, hipófisis, intestino anterior e hígado). Más concretamente, en estos animales que estaban mantenidos en condiciones de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y alimentados diariamente dos horas después del encendido de las luces, se detectó un claro ritmo diario de expresión de *gper1b* con el máximo durante la fase oscura del día en prácticamente todas las localizaciones estudiadas. De hecho, la acrofase obtenida para el gen *gper1b* en este estudio (figuras D5 y D6) es similar a las observadas previamente para el gen *gper1a*, otro de los genes reloj de la familia *period*, en hipotálamo, hipófisis y cabeza del riñón de carpines mantenidos bajo las mismas condiciones



de fotoperiodo y horario de alimentación (Azpeleta et al., 2012). Este aspecto concreto, apoya el correcto funcionamiento de la maquinaria molecular del reloj en estas localizaciones, si bien sería interesante poder compararlo con algunos de los elementos positivos del bucle principal del mecanismo molecular de los osciladores, como se realizó de forma concreta para el hígado en la presente Tesis Doctoral y que se discutirá más adelante en esta discusión general.



**Figura D5. Distribución anatómica del gen reloj *gper1b* en el encéfalo del carpín dorado.** La diferencia día/noche en la intensidad de la señal detectada se indica con la densidad de puntos rojos. OTec, techo óptico; NAPv, núcleo anterior periventricular; NLTP, parte posterior del núcleo lateral tuberal; NPO, núcleo preóptico; NPPv, núcleo posterior periventricular; NRL, núcleo del receso lateral; PIT, hipófisis; TL, *torus longitudinalis*; Vc, válvula del cerebelo. Esquema realizado a partir de los resultados obtenidos en el capítulo 1.1.

Como se describió en el apartado previo de la presente discusión general las dos señales sincronizadoras más relevantes, fotociclo y ciclo ayuno-ingesta, dan lugar a dos sistemas de osciladores endógenos que, respectivamente se conocen con los nombres de “osciladores sincronizables por la luz” (LEOs) y “osciladores sincronizables por el alimento” (FEOs), dependiendo de si son más o menos sensibles a cada una de estas señales rítmicas. En este sentido, es importante resaltar que debido a las condiciones ambientales de fotoperiodo y alimentación de los carpines durante el desarrollo de los experimentos que componen la presente Tesis Doctoral, es muy complicado, sino imposible, describir con precisión la categoría a la que pertenecen cada uno de los osciladores encontrados como “sincronizables por luz” o “sincronizables por el alimento”. De acuerdo con esto, la clasificación propuesta a continuación y a lo largo de esta discusión general se basa principalmente en datos de otros estudios realizados en vertebrados y, con especial énfasis en teleósteos, sobre la relación de las áreas donde se ha detectado presencia y ritmicidad diaria del gen reloj *gper1b* con las áreas descritas en otros estudios asociadas a la detección y transmisión de información de tipo lumínica y del status energético del organismo. Para una mejor clasificación de los osciladores, sería necesaria la realización de estudios complementarios en los que se modificasen las

condiciones lumínicas ambientales con respecto a las condiciones de alimentación. Con este tipo de aproximaciones podría describirse más detalladamente la relación de cada una de las estructuras del sistema circadiano presentadas en el presente trabajo como “más sensibles a la información lumínica” o “más sensibles a la información de ingesta”. En este sentido, estudios realizados en mamíferos en los que los animales han sido alimentados durante la fase habitual de inactividad han mostrado un cambio de fase en determinados osciladores endógenos que presentan una mayor sensibilidad al horario de alimentación que a la señal del fotoperiodo, destacando localizaciones del hipotálamo, así como múltiples osciladores periféricos incluyendo el sistema digestivo y el hígado (Damiola et al., 2000; Davidson et al., 2003; Hara et al., 2001; Schibler et al., 2003; Stokkan et al., 2001).

Resultados de la presente Tesis Doctoral muestran que a nivel encefálico (figura D5), determinadas áreas asociadas al mismo tiempo con regiones fotosensibles y con sistemas de regulación de la ingesta y balance energético como se ha discutido previamente presentan una marcada ritmicidad diaria de *gper1b*, lo que les hace buenos candidatos para ser sincronizables tanto por la luz como por la ingesta, pudiendo categorizarse a la vez como osciladores sincronizables por la luz (LEOs) y osciladores sincronizables por el alimento (FEOs). Entre ellas, el análisis anatómico del hipotálamo reveló que una gran cantidad de núcleos hipotalámicos presentan diferencias día/noche mostrando un patrón de expresión muy similar al descrito previamente para el pez cebra (Weger et al., 2013). De hecho, entre todos los núcleos analizados, el núcleo anterior periventricular homólogo anatómico al NSQ de mamíferos muestra una marcada diferencia día/noche en su expresión caracterizada por una ausencia total de señal de la sonda para *gper1b* en las muestras obtenidas a primera hora del día (según los resultados obtenidos por hibridación *in situ*) y una elevada expresión nocturna. Esta completa o casi completa ausencia de señal para la sonda de *gper1b* durante la fase diurna aparece igualmente en otras regiones del encéfalo como la zona gris periventricular del techo óptico, el *torus longitudinalis*, y la válvula del cerebelo (figura D5), de forma semejante a lo descrito en el pez cebra (Moore y Whitmore, 2014; Weger et al., 2013).

Por otra parte, otras de las localizaciones centrales donde se detectaron ritmos de expresión del gen *gper1b* en carpín parecen pertenecer de una forma más evidente a una sola de estas dos categorías siendo LEOs o FEOs de manera diferenciada. Entre ellos, se encuentran dos núcleos hipotalámicos (el núcleo del receso lateral y la parte posterior del núcleo lateral tuberal) que están localizados en áreas relacionadas con ingesta y balance energético pero parecen independientes de la señal del fotociclo, perteneciendo al grupo de FEOs y la

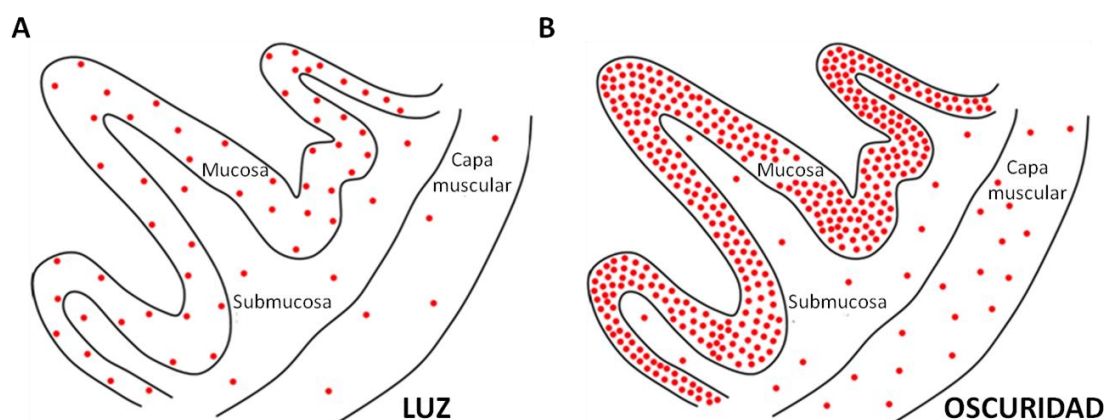
habénula que pertenece al grupo de LEOs siendo, en principio, independiente de las señales hormonales relacionadas con el balance energético en teleósteos.

Al igual que las regiones centrales, en los tejidos periféricos estudiados (hipófisis, intestino anterior e hígado) la expresión de *gper1b* es rítmica, con el pico de expresión durante la noche. Comparando las acrofases, parece que la acrofase observada en las localizaciones periféricas precede ligeramente a la observada en tejidos centrales como se ha observado previamente en el pez cebra cuando se estudiaron los genes *zfbmal1*, *zfbmal2* y *zfclock* (Cermakian et al., 2000). Este ligero avance en la acrofase podría ser un indicio de que los osciladores periféricos responden de manera “independiente” a los diferentes sincronizadores (fotoperiodo y horario de alimentación) ya que no parece posible que sean consecuencia de la acción sincronizadora de algún “maestro” localizado en el cerebro, como sucede en el caso de los mamíferos, donde los ritmos de genes reloj en el NSQ se encuentran avanzados con respecto a los ritmos en periféricos (Morse y Sassone-Corsi, 2002).

Sorprendentemente, la amplitud del ritmo de *gper1b* en la hipófisis es bastante más pequeña (5 unidades relativas) que la observada previamente para otros genes de la misma familia, *gper1a* y *gper3* (en torno a 10 unidades relativas) en carpines mantenidos en las mismas condiciones (Azpeleta et al., 2012), así como en el caso de ratas mantenidas en las mismas condiciones de fotoperiodo y alimentadas *ad libitum* (Girotti et al., 2009). Esto en primer lugar parece sugerir una regulación distinta de los diferentes genes de la familia *per*, como se discutirá más adelante en profundidad, mostrando una menor sensibilidad de este gen para las señales cíclicas a nivel hipofisario y en segundo lugar, puede indicar un papel menos relevante en la sincronización de la hipófisis por parte del gen *gper1b* que por otros genes de esa familia.

Por otro lado, las amplitudes de los ritmos encontrados en intestino anterior (figura D6) e hígado del carpín en este trabajo son mucho mayores que las observadas no solo en el otro periférico estudiado, la hipófisis, sino también mayores a las observadas a nivel central. Esto podría sugerir que la expresión de los genes reloj en estos osciladores, además de estar controlada por el mecanismo molecular de los relojes endógenos, dependa de otras señales sistémicas, como ghrelina y glucocorticoides por ejemplo en el caso del hígado, tal como se ha puesto de manifiesto con los resultados de la presente Tesis Doctoral y se discutirá en detalle en el apartado 3 de esta discusión. En este sentido, estudios previos han demostrado que los osciladores periféricos en vertebrados son altamente sensibles a señales de tipo hormonal, especialmente aquellas relacionadas con el ciclo ingesta-ayuno (Albrecht, 2012; Tsang et al., 2014). Concretamente, en el caso del carpín se ha demostrado la importancia del horario de alimentación en la ritmicidad de los genes reloj hepáticos y del intestino, incluyendo genes de

la familia *period* (Feliciano et al., 2011; Nisembaum et al., 2012), lo que podría explicar los datos obtenidos en estos dos tejidos.



**Figura D6. Distribución anatómica del gen reloj *gper1b* en las diferentes capas del intestino anterior del carpín dorado (mucosa, submucosa y capa muscular).** La diferencia día/noche en la intensidad de la señal detectada se indica con la densidad de puntos rojos. Según datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral.

La presencia de un perfil diario de expresión del transcrito *gper1b* en las diferentes localizaciones anatómicas centrales y periféricas donde se ha podido detectar este gen reloj parece estar indicando la existencia de osciladores funcionales, es decir, de nodos funcionales del sistema circadiano del carpín. Sin embargo, para poder considerar estos osciladores como osciladores endógenos, además de presentar la maquinaria molecular del reloj con una ritmicidad diaria en condiciones de presencia de los dos sincronizadores principales (fotociclo y alimentación fijada), deben ser capaces de mantener estas oscilaciones rítmicas en condiciones de ausencia de sincronizadores o, condiciones de curso libre (Pittendrigh, 1960). En este sentido, queda por responder a la pregunta de si todos estos osciladores detectados en los carpines mantenidos en condiciones de 12L: 12D, y alimentados diariamente dos horas después del encendido de las luces son capaces de actuar como verdaderos osciladores endógenos del sistema circadiano del capín. Estudios previos en carpín ponen de manifiesto la presencia de ritmicidad de determinados genes reloj de las familias *per* y *cry* en el hígado (Feliciano et al., 2011) y el intestino posterior en condiciones de curso libre (Nisembaum et al., 2012), lo que parece indicar que, al menos en estas localizaciones, existen osciladores endógenos. Con respecto a esta cuestión, como parte de la presente Tesis Doctoral se estudió en profundidad si el oscilador presente a nivel hepático es verdaderamente uno de los nodos endógenos del sistema circadiano de teleósteos como se discutirá en profundidad en el apartado 3 de la presente discusión general.

Pero, ¿qué pasa con la posible presencia de un oscilador “maestro” en teleósteos? Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral son lejanamente suficientes para poder definir cualquiera de las áreas que muestran expresión y ritmicidad diaria de *gper1b* como posible estructura responsable de la sincronización del resto del organismo. En este sentido, como ya se ha discutido, la única propuesta que puede realizarse es el rechazo a una posible influencia de cualquiera de los osciladores encefálicos estudiados en la generación de los ritmos observables en los osciladores periféricos analizados en esta Tesis, debido al ligero avance de fase de estos osciladores periféricos. Sin embargo, no es descartable la posible función de regulador de estos osciladores periféricos por parte de otros osciladores centrales como los clásicamente propuestos como la pineal y la retina (Falcón, 1999; Falcón et al., 2003; Yáñez et al., 2009).

Por otro lado, es importante resaltar, como ya se ha discutido previamente, que en todos los casos las acrofases coinciden en la escotofase indicando que todos los osciladores del organismo están trabajando en sintonía. Más aún, estos osciladores parecen estar anticipando la llegada de la luz y del alimento (datos de la presente Tesis; Feliciano et al., 2011; Nisembaum et al. 2012) pero ¿qué señales pueden estar estableciendo comunicación entre estos osciladores para conseguir un funcionamiento sincrónico de todos ellos en la red circadiana del carpín?

Hasta el momento se ha demostrado que la comunicación entre osciladores parece tener un componente de tipo neural (Ashe y Bushara, 2014; Colwell, 2011; Evans et al., 2015; Goel y Buonomano, 2014; Hirai et al., 2015) y otro de tipo hormonal (Di Cara y King-Jones, 2013; Leliavski et al., 2015; Pevet y Challet, 2011; Tsang et al., 2014). En este sentido, la presencia de una menor jerarquización del sistema circadiano de los peces sugiere que la comunicación hormonal entre osciladores puede ser más relevante en este grupo de vertebrados. En la mayoría de los casos, las hormonas consideradas candidatas para actuar como posibles señales de comunicación entre osciladores deben caracterizarse por presentar una ritmicidad diaria en sus niveles que les permita por tanto actuar como señales temporales internas para los distintos relojes endógenos. Por este motivo, en la presente Tesis doctoral que ha estudiado la existencia de posibles ritmos diarios para las dos hormonas de interés, la ghrelina y los glucocorticoides.

Con respecto a **la ghrelina**, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral describen por primera vez en teleósteos la presencia de un patrón de expresión rítmico cercano a 24 h en los genes para el sistema ghrelinérgico en hipotálamo y tracto

gastrointestinal. En este sentido, según los resultados obtenidos, la expresión de ghrelina tanto a nivel central como en su principal lugar de síntesis, el tracto gastrointestinal, sigue un patrón rítmico con los valores más elevados durante la fase nocturna anticipando la llegada de la luz y el alimento. En mamíferos, la ritmicidad en la ghrelina ha sido detectada previamente en las células oxínticas de ratones (LeSauter et al., 2009), donde el pico de concentración de proteína se encuentra anticipando la llegada del alimento, al igual que en el caso de la concentración plasmática de la hormona en ratas donde se observa una mayor concentración diurna anticipando la comida en animales con alimentación *ad libitum*, con una caída de los niveles durante la fase de actividad de estos roedores (Bodosi et al., 2004; Sánchez et al., 2004) y se mantiene esta anticipación al alimento al restringir el horario de alimentación a dos horas durante el periodo diurno observándose un cambio en la fase de esta hormona (Arellanes-Licea et al., 2014). Estos datos de mamíferos coinciden con lo observado para el carpín en la presente Tesis Doctoral, puesto que el aumento de ghrelina se da también en la fase inactiva de los animales, que en las condiciones de mantenimiento de este trabajo (12L:12D y comida a ZT 2) es la fase oscura.

En el caso del receptor de ghrelina, este es el primer estudio en vertebrados que muestra la existencia de un ritmo diario de su expresión. En los resultados obtenidos se muestra la presencia de ritmicidad diaria del receptor de ghrelina en hipotálamo e hipófisis, dos de las localizaciones más relevantes para la regulación de la ingesta y el balance energético del organismo, mientras que en el resto de localizaciones no muestra este perfil rítmico diario (cerebro anterior y posterior y tracto gastrointestinal). Esto parece indicar una regulación de su expresión tejido-dependiente y permite sugerir una relación más profunda entre los receptores localizados en hipotálamo e hipófisis con el sistema circadiano. Además, el hecho de que tanto la ghrelina como su receptor presenten un perfil rítmico de su expresión sugiere que este sistema hormonal puede ser considerado como posible vía de entrada de información al sistema circadiano.

El hecho de que el receptor de ghrelina no solamente se encuentre presente en las mismas localizaciones encefálicas y periféricas donde se ha detectado expresión de este gen reloj, sino que tanto la propia ghrelina como el receptor tengan una expresión rítmica diaria parecen apuntar al sistema ghrelinérgico como un importante punto de entrada al sistema circadiano. A nivel encefálico, el hecho de que la ghrelina y su receptor tengan ritmicidad diaria en el hipotálamo, así como que la distribución anatómica del receptor en esta localización coincida con la encontrada para el gen reloj *gper1b* y que la acrofase de los tres (*preprohrelina*, *ghs-r1a* y *gper1b*) coincida en la fase oscura son datos que apoyan fuertemente

la posible acción de la ghrelina como señal moduladora de los osciladores hipotalámicos del carpín. En este sentido se ha demostrado que la ghrelina induce ligeramente (1,5-2 veces) la expresión de genes reloj (*gper1a* y *gper3*) en el hipotálamo del carpín tras una inyección intraperitoneal (Nisembaum et al., 2014b), habiéndose propuesto que podría estar implicada en la aparición de la FAA (Nisembaum et al., 2014b), tal como se ha sugerido que puede ocurrir en mamíferos (Kumar et al., 2015; LeSauter et al., 2009; Patton y Mistlberger, 2013).

Por su parte, en el tracto gastrointestinal, principal lugar de síntesis de la ghrelina, se detectaron, mediante técnicas de imagen, las mayores diferencias día/noche en la expresión del gen *gper1b* en la capa mucosa (Figura D6) que se corresponde con el área de mayor presencia del transcrito del gen de ghrelina *ghs-r1a* (Figura D2). Como parte de la presente Tesis Doctoral (capítulo 2.1) también se describe la existencia de este receptor de ghrelina, *ghs-r1a*, en el hígado del carpín donde hay también una alta expresión del gen reloj *gper1b* como ya se ha comentado previamente, apoyando la teoría de la ghrelina como importante señal circadiana, no sólo en el encéfalo sino también a nivel periférico, como se discutirá más adelante de forma concreta para el hígado.

Por otro lado, los **glucocorticoides** han sido considerados unas de las señales hormonales más determinantes en la regulación de los ritmos de los osciladores periféricos en mamíferos (Albrecht, 2012; Reddy et al., 2007; Schmutz et al., 2012; Sujino et al., 2012) y, de hecho, se ha descrito su ritmicidad circadiana en multitud de vertebrados desde peces hasta mamíferos (Kalsbeek y Fliers, 2013; López-Olmeda et al., 2013; Nader et al., 2010; Ota et al., 2012). Sin embargo, hasta la fecha, los datos que proponían posibles ritmos de cortisol, glucocorticoide endógeno en el carpín, eran bastante escasos y poco concluyentes (Singley y Chavin, 1975). Así pues, como parte de la presente Tesis Doctoral se incluyen los resultados de los niveles plasmáticos de cortisol a lo largo de un ciclo de 24 h en animales mantenidos en fotoperiodo 12L:12D y alimentados dos horas después del encendido de las luces. Coincidiendo con lo que se esperaba según la bibliografía tanto para teleósteos (López-Olmeda et al., 2013; Pickering y Pottinger, 1983; Polakof et al., 2007) como para mamíferos (Kalsbeek y Fliers, 2013; Kalsbeek et al., 2011; Kalsbeek et al., 2012), los niveles plasmáticos de glucocorticoides en carpín muestran un marcado perfil diario con la acrofase situada anticipando la fase de actividad del carpín. Esto quiere decir que los niveles más elevados se encuentran anticipando la luz debido a que los carpines alimentados en la fase luminosa tienen comportamiento diurno tal como se ha descrito previamente en multitud de trabajos (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001; Sánchez-Vázquez et al., 1996; Sánchez-Vázquez et al., 1997; Vivas et al., 2011) y se ha corroborado en la presente Tesis Doctoral.

Si bien se propuso como parte del proyecto de la presente Tesis Doctoral la localización anatómica de los receptores de glucocorticoides, finalmente no pudo realizarse. Sin embargo, un estudio realizado en otro teleósteo, la trucha arcoíris (Teitsma et al., 1998) muestra la presencia de estos receptores de glucocorticoides en localizaciones encefálicas como el telencéfalo dorsal y ventral, la región preóptica y el hipotálamo mediobasal (concretamente en los núcleos periventricular posterior, NPPv; anterior periventricular, NAPv; y tuberal lateral posterior, NLTp). Una distribución similar incluyendo la pars distalis de la hipófisis fue detectada en el caso de la carpa común (*Cyprinus carpio*, Stolte et al., 2008). Esta distribución tiene bastante en común con la observada para los transcritos de *gper1b*, lo que podría indicar la posible interacción entre los glucocorticoides y el sistema circadiano a estos niveles.

A nivel periférico, además de la presencia en la hipófisis, se ha detectado el receptor de glucocorticoides en el intestino donde actúa principalmente como regulador del transporte de agua y de iones desde el exterior del organismo. En este sentido, un estudio en tilapia (*Oreochromis mossambicus*) mostró una distribución del receptor de glucocorticoides con mayor presencia en el intestino anterior y en la capa mucosa (Takahashi et al., 2006) que, como se describió previamente, es la localización donde más diferencias día/noche en la expresión de *gper1b* se observaron en el carpín en resultados de la presente Tesis Doctoral, asimismo, también fue detectado en intestino de dorada (Teles et al., 2013). Finalmente, también se han encontrado receptores de glucocorticoides en el hígado en la lubina y la dorada (Teles et al., 2013; Vazzana et al., 2008), así como en el carpín (datos del grupo no publicados).

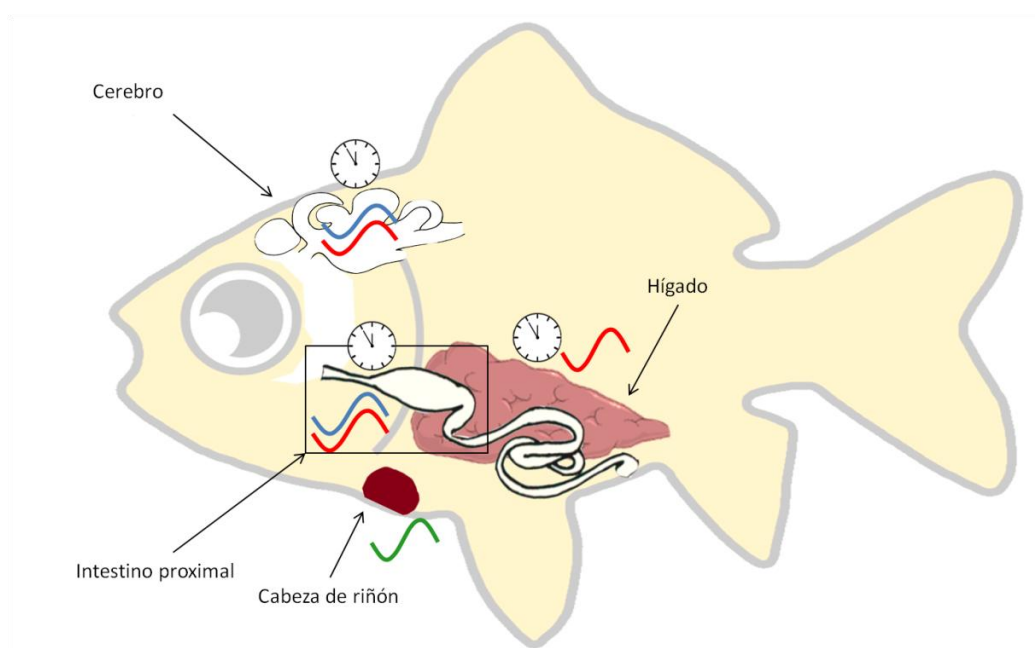
El hecho de que esta señal (ritmo de cortisol) coincida temporalmente con la ghrelina, mostrando la acrofase en el mismo momento podría implicar que ambas señales estén actuando de manera sinérgica en la regulación de los diferentes osciladores endógenos del organismo. De hecho, la presencia del receptor de glucocorticoides en otras especies de teleósteos (discutida en el párrafo anterior), en las mismas áreas donde se ha encontrado el receptor de ghrelina en el carpín en el presente trabajo, incluyendo determinados núcleos hipotalámicos, la mucosa intestinal y el hígado, refuerza una posible acción conjunta de ambas señales en la modulación del sistema circadiano en esas localizaciones

Por otro lado, en mamíferos se ha estudiado la comunicación directa entre la ghrelina y los glucocorticoides en la medida en la que la primera es capaz de inducir la síntesis de los segundos (Rucinski et al., 2009). Esta acción de la ghrelina se ha descrito a nivel local, gracias a



la presencia de receptores de ghrelina en la glándula adrenal (Asakawa et al., 2001b; Carraro et al., 2004; Ghelardoni et al., 2006; Gnanapavan et al., 2002), e incluso a una posible síntesis local de ghrelina activa ya que se ha detectado tanto expresión de *preproghrelina* como presencia de GOAT, la enzima activadora de la ghrelina (Rucinski et al., 2009), en esta glándula. Así mismo, también en mamíferos la ghrelina induce la liberación de glucocorticoides a nivel hipofisario a través de la inducción de la ACTH (Stevanović et al., 2007). En teleósteos, también se ha descrito la acción de la ghrelina como inductor de los niveles plasmáticos de cortisol en el lenguado de verano (*Paralichthys dentatus*; Breves et al., 2009). El hecho de que en diversos grupos de vertebrados incluyendo teleósteos la ghrelina sea capaz de estimular la liberación de glucocorticoides apoya la presencia de ritmos similares en ambas hormonas con el pico anticipando el horario de alimentación y la llegada de luz y favorece la perspectiva de que ambas señales actúen sinérgicamente para poner en hora el reloj circadiano del carpín.

En la figura D7 se muestra un esquema explicativo de los osciladores que se han encontrado en el carpín gracias a los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral así como la ritmicidad de las dos posibles señales hormonales reguladoras del sistema circadiano del carpín que han sido estudiadas en este trabajo.



**Figura D7. Osciladores del sistema circadiano del carpín estudiados en la presente Tesis Doctoral.**

Los resultados obtenidos en el primer capítulo demuestran la presencia de osciladores funcionales en el cerebro, el intestino proximal (esófago, bulbo intestinal, bucle en “J” e intestino anterior) y el hígado del carpín (representados con los relojes), detectados gracias a la presencia y ritmicidad diaria del gen reloj *gper1b* (ondas sinusoidales rojas). Asimismo, los resultados obtenidos muestran ritmicidad diaria de dos posibles señales sincronizadoras: el sistema ghrelinérgico (ondas sinusoidales azules) en el cerebro y el tracto gastrointestinal y los niveles plasmáticos de cortisol

sintetizado en la cabeza del riñón (onda sinusoidal verde) que además están en fase con el gen reloj *gper1b* y entre ellos.

### 3. EL HÍGADO DEL CARPÍN COMO OSCILADOR

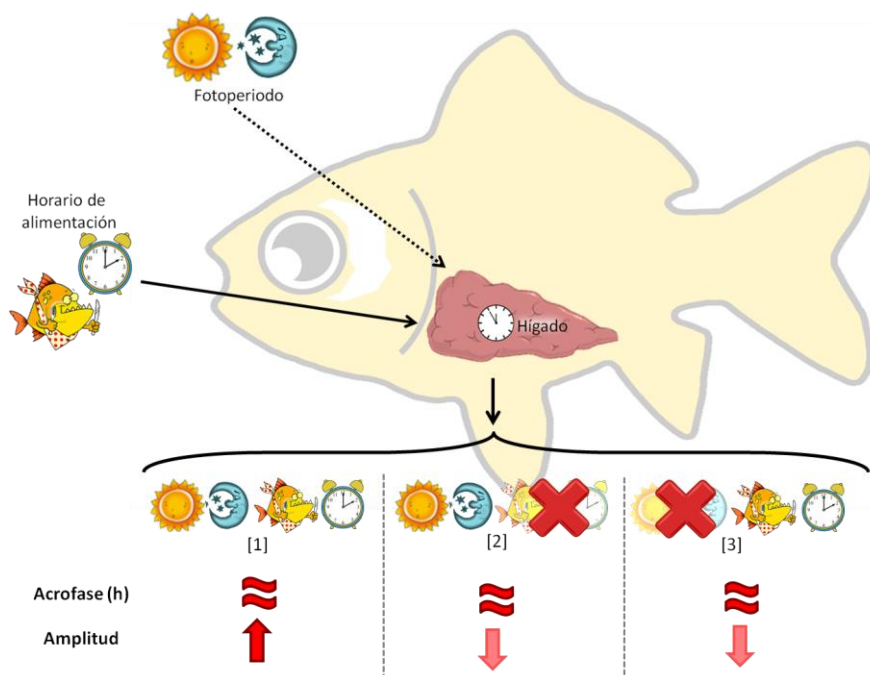
Entre los osciladores periféricos, el hígado es uno de los principales reguladores del metabolismo primario (Schmutz et al., 2012) y en mamíferos se ha descrito como uno de los osciladores más sensibles a diferentes señales como la hora de alimentación y los niveles de determinadas hormonas, incluyendo los glucocorticoides (Kornmann et al., 2007; Schmutz et al., 2012; Stokkan et al., 2001; Yamamoto et al., 2005), considerándose como el principal lugar de convergencia de la información circadiana con la regulación del metabolismo (Eckel-Mahan y Sassone-Corsi, 2013; Schmutz et al., 2012). En este sentido, muchos de los genes que muestran ritmicidad circadiana en el hígado han sido relacionados con procesos metabólicos en mamíferos (Oishi et al., 2005; Reddy et al., 2007).

En carpín, el hígado es una de las localizaciones anatómicas donde se han encontrado ritmos de genes reloj modulados por diferentes señales ambientales, ciclo luz oscuridad y horario de alimentación, (resultados de la presente Tesis Doctoral; Feliciano et al., 2011; Tinoco et al., 2014; Velarde et al., 2009) y endógenas (resultados de la presente Tesis Doctoral; Nisembaum et al., 2014a; Nisembaum et al., 2014b).

Resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral muestran que en presencia de ambas señales sincronizadoras (ciclo luz oscuridad y ciclo ingesta-ayuno), existen ritmos de los genes reloj analizados de ambos bucles, principal (*gper1a*, *gper1b*, *gbmal1a* y *gclock1a*) y accesorio (*grev-erba*) en el hígado del carpín (capítulo 2.3, resumido en la figura D8). De hecho, las acrofases encontradas para los genes *gper1a* y *gbmal1a* en el oscilador hepático coinciden con las previamente observadas en otros tejidos (eje hipotálamo-hipófisis-interrenal) en carpines mantenidos en las mismas condiciones (Azpeleta et al., 2012). Además, los ritmos detectados coinciden con el funcionamiento habitual de la maquinaria molecular de los osciladores. Esto es, su capacidad de expresarse siguiendo un patrón rítmico cercano a 24 h, con un desfase de aproximadamente 12 horas entre los elementos positivos y los negativos del bucle principal del oscilador molecular (Buhr y Takahashi, 2013; Dunlap, 1999; Panda et al., 2002; Partch et al., 2014). Es destacable el hecho de que en estas condiciones, las amplitudes de los ritmos de expresión es muy variable entre los genes reloj analizados. Los genes de la familia *per* (*gper1a*, *gper1b* y *gper3*) son de los que mayores amplitudes tienen, junto con *grev-erba*, respecto a las amplitudes de los elementos positivos del bucle principal (*gclock1a* y *gbmal1a*), lo que podría ser un reflejo de que los genes de la familia *per* (y quizá *grev-erba*)

además de estar regulados por el dímero CLOCK-BMAL1, pueden modularse por otras señales, produciendo ritmos de mayor amplitud. En este sentido, la modulación de forma concreta de la familia de genes *per* por diversas hormonas, se aborda más adelante en la presente discusión general.

Por otro lado, cuando los carpines están expuestos a la acción de un único sincronizador (fotoperiodo u horario fijado de alimentación), los ritmos de los genes reloj en el oscilador hepático son asimismo apreciables con acrofases localizadas en torno a la misma franja horaria que en presencia de ambos, pero con amplitudes disminuidas (Feliciano et al., 2011; Tinoco et al., 2014) indicando que la robustez de los ritmos depende de la presencia de ambas señales ambientales que trabajan sinérgicamente en el mantenimiento del mecanismo molecular del reloj (tal como se resume en la Figura D8). En este sentido, en carpín mantenido en condiciones de luz-oscuridad pero, con horario de alimentación aleatorio se ha observado un ritmo del gen *gper1a* en el hígado indicando la sensibilidad de este tejido a la información fótica ambiental (resultados de la presente Tesis Doctoral, capítulo 2.3). Por otro lado, cuando los carpines son mantenidos en condiciones de luz constante y se estudia el efecto del horario de la alimentación sobre el sistema circadiano, se observa que los genes *gper1a*, *gper3* y *gcry3* son rítmicos en el oscilador hepático en condiciones de horario de alimentación fijo y aleatorio (Feliciano et al., 2011; Tinoco et al., 2014), indicando por un lado, que el hígado del carpín es altamente sensible al horario de alimentación como se ha demostrado previamente para mamíferos (Damiola et al., 2000; Kornmann et al., 2007; Stokkan et al., 2001) y por otro lado, el hecho de que los animales alimentados aleatoriamente presenten ritmos de determinados genes reloj en el hígado, sugiere que el hígado podría ser sincronizado al horario de la última comida (Feliciano et al., 2011). De hecho, si se comparan los ritmos de genes reloj observados en regiones encefálicas como el techo óptico y el hipotálamo de carpines mantenidos en condiciones de luz constante y alimentación aleatoria con los ritmos de los mismos genes observados en hígado, se observa que estos últimos tienen amplitudes considerablemente más grandes (Feliciano et al., 2011) lo que sugiere que el horario de alimentación es una señal sincronizadora más potente en el hígado que en regiones encefálicas en el carpín.



**Figura D8. Parámetros cronobiológicos de los ritmos observados para el gen *gper1a* en diferentes condiciones ambientales de fotoperiodo y horario de alimentación.** El hígado está sincronizado de manera directa por el horario de alimentación (flecha continua) e indirectamente por el ciclo luz-oscurecimiento (flecha punteada). En presencia de ambos sincronizadores la amplitud es mayor que en presencia de uno de ellos solamente, sin embargo, la acrofase de todos los ritmos observados permanece invariable en presencia de uno de ellos o los dos. [1 y 2] Datos obtenidos como parte de la presente Tesis Doctoral. [3] Datos tomados de Feliciano et al., 2011 y Tinoco et al., 2014.

Por otro lado, una vez comprobado que en condiciones *in vivo*, el hígado se comporta como un oscilador, que puede ser sincronizado además por el fotociclo, así como por un horario fijo de alimentación, la siguiente pregunta es averiguar si dichas oscilaciones son endógenas, es decir, si se originan en el propio hígado, o si las oscilaciones de los genes reloj responden a otro oscilador y/ a posibles señales sistémicas. Como parte de la presente Tesis Doctoral se ha realizado el análisis del funcionamiento del oscilador hepático en condiciones *in vitro*, completamente aislado de señales sistémicas. En estas condiciones las oscilaciones de los genes reloj en el oscilador hepático se encuentran prácticamente desaparecidas con la única excepción del gen *gper1b* que *in vivo* presenta la amplitud mayor en presencia de luz-oscurecimiento y horario de alimentación. Estos datos, se encuentran en la misma línea de los obtenidos en los fibroblastos de rata en cultivo, donde la amplitud de los ritmos es prácticamente inexistente (Balsalobre et al., 2000), así como de los observados en cultivos de hepatocitos de ratón donde se observa igualmente una cierta ritmicidad de los genes reloj (Tao et al., 2015) y hepatocitos de rata donde se ha estudiado la ritmicidad del gen *rev-erba* (Pineda-Torra et al., 2000). Sin embargo la falta de detección de ritmos podría deberse también a una pérdida de la coherencia en los periodos de los ritmos de expresión de los

genes reloj en las diferentes células hepáticas que no permitiría discriminar una ritmicidad del tejido completo, tal como se ha sugerido en otros modelos (Leise et al., 2012; Nagoshi et al., 2004; Welsh et al., 2004). El mantenimiento de la ritmicidad del gen *gper1b* en el hígado en condiciones de ausencia absoluta de señales sugiere que el oscilador hepático del carpín pueda tener un carácter endógeno, como se describió previamente para los hepatocitos de rata (Pineda-Torra et al., 2000).

### **Ghrelin como señal moduladora del sistema circadiano del carpín. Importancia de la ingesta en la regulación circadiana.**

Como se ha comentado previamente en la presente discusión, el hígado es el oscilador más sensible a la señal sincronizadora de presencia de alimento (Albrecht, 2012; Eckel-Mahan y Sassone-Corsi, 2013; Schmutz et al., 2012; Tsang et al., 2014). Siendo así, es lógico pensar que probablemente existen diversas señales que pueden llegar al hígado para indicarle el estado energético del organismo. Entre todas las señales relacionadas con el balance energético, los niveles plasmáticos de las hormonas orexigénicas y anorexigénicas presentan bastante interés como vías de entrada al oscilador hepático. En la actualidad se ha empezado a estudiar la ghrelina como señal de entrada del sistema circadiano, si bien, por el momento hay pocos estudios sobre esta cuestión y ninguno de ellos está centrado en la acción de la ghrelina sobre el oscilador hepático. Dentro de la poca información existente, en los mamíferos se ha visto la necesidad de la ghrelina para la regulación de la actividad anticipatoria al alimento (Blum et al., 2009; LeSauter et al., 2009; Nisembaum et al., 2014b), considerada una de las salidas del FEO. Asimismo, la ghrelina es capaz de avanzar la fase del gen reloj *Per2* y de la tasa neuronal de disparo en NSQ en cultivo (Yannielli et al., 2007).

En el caso del carpín, un estudio previo de nuestro grupo de investigación mostró que una inyección intraperitoneal aguda con ghrelina induce en el hígado la expresión de tres genes de la familia *period* (*gper1a*, *gper2a* y *gper3*) una hora después de la inyección dejando de haber un efecto observable sobre estos genes 3 horas después de la inyección (Nisembaum et al., 2014b). Además, al utilizar un antagonista general de receptores de ghrelina el efecto sobre el oscilador hepático se bloquea, indicando especificidad de la ruta de señalización por ghrelina (Nisembaum et al., 2014b). Se ha descrito que en el hígado del carpín los receptores de ghrelina más abundantes son los dos subtipos de GHS-R1A (GHS-R1A1 y GHS-R1A2) (Kaiya et al., 2010). De hecho, resultados de la presente Tesis Doctoral muestran anatómicamente la presencia de sus transcritos mediante hibridación *in situ* en las células hepáticas (capítulo 2.1). Estos receptores de membrana actúan mayoritariamente a través de la vía de señalización

PLC-PKC (Kojima et al., 1999; Yin et al., 2014) y, en efectos relacionados con la regulación de la ingesta, también por la vía AC-PKA (Kohno et al., 2003; Yin et al., 2014).

Los resultados de la presente Tesis Doctoral, como se ha discutido en el capítulo 3.1, demuestran que la acción de la ghrelina está transducida por medio de ambas vías para la regulación de la expresión de los genes reloj en el hígado del carpín, traducándose en una inducción de todos ellos (*gper1a*, *gper1b*, *gper2a*, *gper3*, *gbmal1a*, *gclock1a* y *grev-erba*). Estos resultados se han resumido en el esquema D9. Si bien es destacable el hecho de que la vía más relevante parece ser la vía PLC-PKC a través de la cual la ghrelina actúa sobre todos los genes reloj estudiados, mientras que el papel de la vía AC-PKA está reducido a la modulación de los genes *gbmal1a* y *grev-erba*. Estos resultados ponen de manifiesto el hecho de que los genes reloj son diferencialmente sensibles a las distintas señales reguladoras del reloj. De hecho, la doble regulación de la inducción de los genes reloj *gbmal1a* y *grev-erba* mediante ambas vías de transducción intracelular de la señal sugiere que ambos genes pueden ser especialmente importantes en la modulación por ghrelina del reloj hepático. De hecho, estos genes son más sensibles a otras señales hormonales relacionadas con la regulación de la ingesta y el balance energético como el glucagón y la leptina en osciladores endógenos de mamíferos (Sun et al., 2015; Vieira et al., 2012), mostrando la relevancia de estos dos genes reloj como dianas específicas dentro del sistema circadiano para el reconocimiento de la situación energética del organismo. Curiosamente, los genes *Per* del carpín no parecen afectarse después de una hora en presencia de forskolin, indicando que la vía del AMPc-PKA no parece capaz de modular esta familia de genes, al menos a tiempos cortos, en el carpín al contrario de lo que sucede en roedores y humanos (Motzkus et al., 2000; Yagita y Okamura, 2000).

La ghrelina es una señal de hambre que induce tanto el comportamiento de búsqueda del alimento como la propia ingesta (Abizaid y Horvath, 2012; Depoortere, 2009). Respecto a sus efectos sobre el hígado, se ha descrito que la ghrelina administrada a nivel central en roedores es capaz de aumentar la degradación del glucógeno y los triglicéridos en el hígado, así como regular los genes hepáticos implicados en el metabolismo lipídico y de la glucosa (Stark et al., 2015). Básicamente, un aumento de los niveles de ghrelina en sangre son responsables de preparar al hígado para hacer frente a una situación de hambre en la que se van a movilizar reservas de glucosa y lípidos (Li et al., 2014b). Tanto el metabolismo de glucosa como de lípidos ha sido relacionado en mamíferos con el funcionamiento de los osciladores endógenos (Eckel-Mahan y Sassone-Corsi, 2013; Froy, 2007; Johnston, 2014; Oosterman et al., 2015), describiéndose, por ejemplo, la importancia del gen *grev-erba* en ambos procesos (Duez y Staels, 2009). Si bien los resultados mostrados en la presente Tesis Doctoral no son

suficientes para establecer una relación entre el metabolismo de lípidos y glucosa con la ghrelina y el sistema circadiano en el carpín, el hecho de que se haya demostrado la relación ghrelina-genes reloj, junto con resultados previos que relacionan a la ghrelina con el metabolismo no solo en mamíferos sino también en peces (Breves et al., 2009; Kang et al., 2011a; Kang et al., 2011b; Kojima y Kangawa, 2005), apoyan la existencia de una verdadera red comunicativa ghrelina-genes reloj-metabolismo hepático también en el carpín. En este sentido, la existencia de una conexión del metabolismo con el oscilador hepático, se sustenta aún más, teniendo en cuenta el papel de los glucocorticoides sobre los genes reloj en el hígado del carpín que se ha demostrado también en la presente Tesis (capítulo 2.2) y se discute a continuación.

### **Glucocorticoides como señales sincronizadoras del sistema circadiano del carpín. Posible efecto del estrés en la regulación circadiana.**

La ritmicidad en la concentración plasmática de glucocorticoides (tanto corticosterona como cortisol) (Kalsbeek y Fliers, 2013; López-Olmeda et al., 2013; Nader et al., 2010; Ota et al., 2012) es una característica que ha permitido considerar a estas hormonas como unas de las posibles señales temporales que pueden sincronizar los diferentes osciladores del sistema circadiano de vertebrados. En este sentido, en la actualidad se conoce la implicación de estas hormonas en la regulación de genes reloj en mamíferos (Balsalobre et al., 2000; Fukuoka et al., 2005; Oishi et al., 2005; Reddy et al., 2007; Schmutz et al., 2012; Sujino et al., 2012; Yamamoto et al., 2005), donde se ha descrito la presencia de elementos de respuesta a los glucocorticoides en el promotor de *Per1* (Reddy et al., 2007; Yamamoto et al., 2005), principalmente afectando al oscilador hepático que presenta una gran cantidad de su transcriptoma regulado vía adrenal (Oishi et al., 2005).

Si bien en teleósteos, la acción de los glucocorticoides como señales sincronizadoras o moduladoras de los genes reloj ha sido mucho menos estudiada (Cavallari et al., 2011; Dickmeis et al., 2007; Dickmeis, 2009; Dickmeis y Foulkes, 2011; Dickmeis et al., 2013), los resultados mostrados en la presente Tesis Doctoral demuestran, no solo un patrón rítmico en la concentración plasmática de cortisol en el carpín dorado, como se ha discutido previamente, sino también la acción moduladora de ritmos de genes reloj en el hígado de esta especie tanto *in vitro* como a través de una inyección aguda IP (capítulo 2.2). En este sentido, al igual que ocurre en mamíferos, se observa una inducción de los genes *gper1a* y *gper1b* por la acción tanto de cortisol como de dexametasona, lo que podría indicar la presencia de un sitio GRE homólogo presente en mamíferos en los genes *per1* del carpín. Aunque en el marco de la

presente Tesis Doctoral no se han realizado con éxito estudios que demuestren la implicación directa de los receptores de glucocorticoides con la acción de cortisol y dexametasona como moduladores de los genes reloj en el hígado del carpín, se ha podido detectar la presencia de estos receptores intracelulares en algunas especies de teleósteos (Teles et al., 2013; Vazzana et al., 2008), lo que apoyaría la posibilidad de que estuvieran presentes en el carpín e implicados en la regulación del oscilador hepático por glucocorticoides.

Más allá del efecto sobre los elementos negativos del bucle principal del oscilador molecular, en la presente Tesis Doctoral se describe también un efecto represor de los glucocorticoides sobre los elementos positivos (*gbmal1a* y *gclock1a*) que apoya una posible acción de cambio de fase por parte de los glucocorticoides. En este sentido, los resultados obtenidos en la presente Tesis (capítulo 2.2) apoyan un posible papel de los glucocorticoides como auténticos mensajeros temporales en el carpín. Como se ha comentado previamente en esta Discusión, cuando el hígado de estos animales se mantiene en cultivo durante varios días, se pierden las oscilaciones diarias de la mayor parte de los genes reloj analizados con la excepción del gen *gper1b*. Sin embargo, tras un tratamiento puntual de 2 horas con dexametasona se observa una recuperación parcial (si bien se recupera la ritmicidad, la amplitud sigue estando muy disminuida) de los ritmos de los diferentes genes reloj del oscilador hepático, resultado similar al obtenido previamente en fibroblastos de rata en cultivo (Balsalobre et al., 2000) y en líneas celulares de pez cebra y el pez ciego de Somalia (*Phreatichthys andruzzii*; Cavallari et al., 2011). El hecho de obtener una recuperación parcial de los ritmos de genes reloj en el hígado tras un tratamiento con glucocorticoides indica que, si bien estas hormonas son capaces de generar ritmos en el oscilador hepático, no son las únicas señales que está recibiendo este órgano *in vivo*, siendo necesarios otros factores fisiológicos para conseguir la amplitud observada en los ritmos de expresión de genes reloj. Tiene lógica que así sea, pues como ya se ha comentado en varias ocasiones, los genes reloj en el hígado son también regulados por la otra señal estudiada en la presente Tesis Doctoral, la ghrelina. Además, tal como se describe en la revisión sobre el oscilador hepático que forma parte del capítulo 2.3 de la presente Tesis Doctoral, tanto la orexina (Nisembaum et al., 2014a) como las señales externas de fotoperiodo y horario de alimentación (resultados de la presente Tesis Doctoral; Feliciano et al., 2011; Tinoco et al., 2014) también son responsables de la regulación de este oscilador en condiciones *in vivo*. Esta múltiple regulación hormonal en el oscilador hepático, implica que los genes reloj sean diana de las diversas señales, cuestión que se tratará más adelante en la presente Discusión (apartado 2 de la presente discusión general).

Las concentraciones de cortisol utilizadas en la presente Tesis Doctoral se encuentran



dentro de los niveles plasmáticos fisiológicos descritos previamente para el carpín (Bernier et al., 1999; de Pedro et al., 1997), estando considerada la concentración más baja empleada (0,1  $\mu$ M) dentro del rango basal (sub-estresante), y las concentraciones más altas (1 y 10  $\mu$ M) a los niveles plasmáticos esperados como la respuesta a una situación estresante. Esto indica que el efecto de los glucocorticoides como moduladores del oscilador hepático no es meramente una consecuencia más de una situación estresante sino que, de manera basal, los glucocorticoides son reguladores del funcionamiento de la maquinaria molecular del hígado del carpín.

Si bien esta información indica que no son necesarios aumentos plasmáticos de cortisol hasta niveles característicos del estrés para afectar la expresión de genes reloj, resulta evidente que, en el caso de un fuerte incremento debido a una situación estresante, causará con mucha probabilidad un desajuste o, al menos, una modificación rápida del funcionamiento del oscilador hepático. De hecho, en roedores, la exposición a un estrés agudo modula efectivamente los niveles del gen *Per1* (Yamamoto et al., 2005), siendo la primera información sobre la relación entre el estrés y el oscilador hepático en vertebrados. En el caso de los teleósteos, no existe ningún estudio por el momento que permita establecer una relación entre el estrés y el funcionamiento del oscilador hepático, si bien en nuestro laboratorio se están realizando análisis preliminares que relacionan la activación del eje de estrés a nivel hipofisario con la modulación de genes reloj hepáticos.

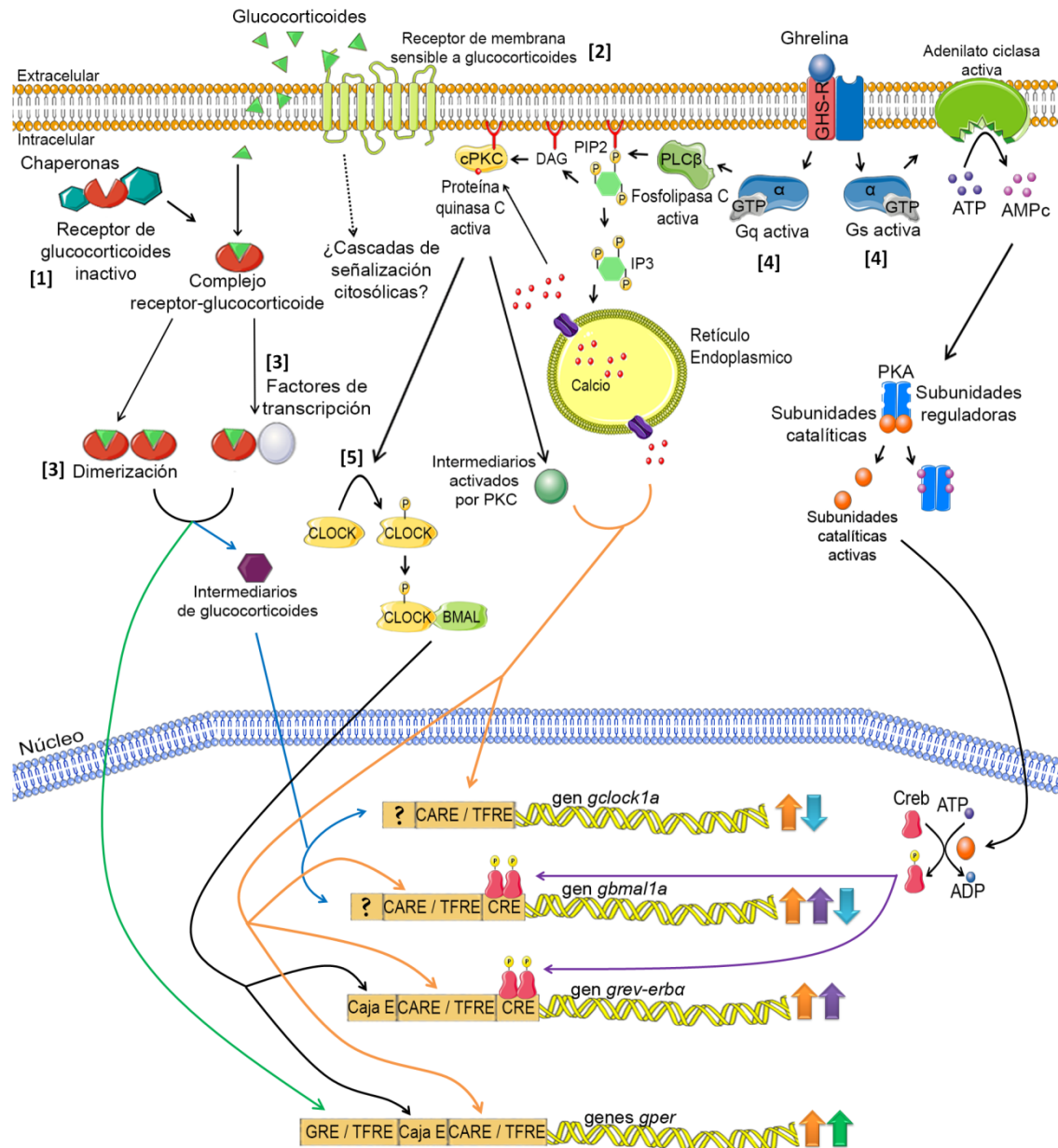
Por otro lado, las consecuencias de las modificaciones del oscilador hepático producidas por este aumento plasmático de los glucocorticoides como respuesta al estrés tampoco se conocen a día de hoy. Sería posible que muchas de las acciones mediadas por glucocorticoides como respuesta a una situación de estrés puedan estar moduladas por el oscilador hepático.

### **Regulación multihormonal del oscilador hepático del carpín.**

En la figura D9 se muestra un resumen de cómo respondería un hepatocito del carpín (en términos de expresión de genes reloj) a la ghrelina y a los glucocorticoides. Según los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se puede concluir que cada uno de los genes que forman parte de la maquinaria molecular del reloj es sensible a las distintas señales de manera diferente, lo que ha de implicar la presencia de elementos diversos en cada uno de los promotores de estos genes reloj. Esta composición debería incluir, al menos en *per1a* y *per1b*, pues son los genes que se inducen con glucocorticoides, sitios de respuesta a los glucocorticoides (GRE), previamente descritos en mamíferos en el promotor de *Per1* (Reddy et al., 2007; Yamamoto et al., 2005). Pero también pueden existir sitios de respuesta a otros

factores de transcripción con los que pueda dimerizar el receptor de glucocorticoides como se ha propuesto en la bibliografía (TFRE; Labeur and Holsboer, 2010; Nicolaides et al., 2010). Por otro lado todos los genes reloj han de poseer cajas E, tradicionalmente descritas hasta el momento en todos los genes regulados por el dímero CLOCK-BMAL1 (Hardin, 2004; Muñoz and Baler, 2003; Zhang et al., 2004). Por último, de los resultados que derivan de los cultivos con ghrelina, los genes reloj probablemente posean sitios de respuesta a calcio (CARE) o a elementos activables por PKC, consecuencia de la activación de la vía PLC-PKC, y sitios de respuesta a AMP cíclico (CRE), responsables de la respuesta mediada vía AC-PKA.

Por lo tanto, el hecho de que los promotores de los múltiples genes reloj sean diferentes facilita la posibilidad de que cada uno de ellos pueda recibir señales diversas y asegura una regulación fina resultado de la recepción en conjunto de múltiples señales sistémicas (bien sean de tipo neural, bien de tipo hormonal). En este sentido, a continuación se discute de forma concreta cuáles pueden ser las diversas señales que recibe la familia de genes reloj *per*, pues es de la que hasta el momento se posee más información.



**Figura D9. Mecanismo de acción de glucocorticoides y ghrelina en el interior de un hepatocito en el carpín dorado.** En el caso del efecto de la ghrelina, en el hepatocito la ghrelina modula la transcripción de los genes reloj a través de las vías PLC-PKC y AC-PKA. A través de la vía PLC-PKC (naranja) induce la expresión de los genes del bucle principal y de *grev-erba*. Por otra parte, a través de la vía de transducción intracelular AC-PKA (morado), induce la expresión de *gbmal1a* y *grev-erba*. Los glucocorticoides regulan la transcripción de los genes reloj mediante la unión a sus receptores intracelulares. Son los responsables de una inducción (verde) de los elementos negativos del bucle principal (*gper1a* y *gper1b*) y una disminución (azul) en el número de transcritos de los elementos positivos de dicho bucle (*gbmal1a* y *gclock1a*). [1] Pratt 1997. [2] Borski, 2000. [3] Nicolaides et al., 2010; Labeur et al., 2010. [4] Yin et al., 2014. [5] Shim et al., 2007.

#### **4. DIFERENTE SENSIBILIDAD DE LOS GENES RELOJ EN EL SISTEMA CIRCADIANO DEL CARPÍN.** **LA FAMILIA *PER* COMO ENTRADA DE SEÑALES HORMONALES AL SISTEMA CIRCADIANO**

Hasta el momento, con los datos que conocemos parece que la familia de genes reloj *period* es el conjunto de genes reloj más sensible a regulación hormonal tanto a nivel hepático como en otros osciladores del organismo. Como se ha discutido previamente, en mamíferos ha sido ampliamente estudiado el efecto de los glucocorticoides sobre los genes *Per* en osciladores periféricos como el hígado (Balsalobre et al., 2000; Fukuoka et al., 2005; Oishi et al., 2005; Reddy et al., 2007; Schmutz et al., 2012; Sujino et al., 2012; Yamamoto et al., 2005). Asimismo, los genes *Per1* y *Per2* se ven alterados a nivel de tejido adiposo blanco en ratas con privación de sueño y mutantes de estos genes presentan cierta resistencia a los problemas derivados de una disrupción de sueño en estos animales como la desregulación de los niveles de leptina, mostrando la relevancia de esta familia como intermediario entre señales sistémicas, el sistema circadiano y el metabolismo (Husse et al., 2012). Igualmente, la expresión de ambos genes *Per1* y *Per2* parece estar alterada en casos de patologías humanas como la diabetes mellitus de tipo 2, demostrándose que ambos genes están correlacionados con el contenido plasmático de insulina (Stamenkovic et al., 2012). La pérdida del péptido vasoactivo intestinal provoca la pérdida de la ritmicidad del gen *Per1* en el NSQ y la glándula adrenal y la alteración de la fase, así como un descenso de la amplitud del gen *Per2* de mamíferos (Loh et al., 2011) indicando la relevancia de esta otra hormona en la regulación de los ritmos de los genes de esta familia *period*. Asimismo, hormonas hipofisarias como la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículoestimulante (FSH) son capaces de resetear los ritmos de *Per1* en ovarios de ratas *in vitro* (Yoshikawa et al., 2009). Por otro lado, estudios de las vías de señalización intracelulares implicadas en la regulación de los genes de esta familia, en mamíferos se ha demostrado la relevancia de múltiples vías como la de la PLC-PKC o la del AMPc-PKA (Motzkus et al., 2000; Yagita y Okamura, 2000), que han sido estudiadas en esta Tesis en el contexto del sistema circadiano del carpín, así como muchas otras. Siendo todos estos algunos ejemplos de la relevancia de la señalización hormonal sobre los genes *period* en mamíferos, el estudio de la regulación de esta familia de genes reloj en teleósteos muestra igualmente que existen gran cantidad de señales hormonales que actúan como vía de entrada para el sistema circadiano de los peces como es el caso del carpín.

Concretamente en esta especie, resultados previos de nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto la modulación de genes *per* por multitud de señales hormonales como la orexina (Nisembaum et al., 2014a) o la ghrelina (Nisembaum et al., 2014b) a nivel de diferentes osciladores (hipotálamo, intestino e hígado) la cual ha continuado estudiándose en

mayor profundidad en esta Tesis a nivel del hígado. A pesar de que el efecto de la ghrelina sobre el oscilador hepático incluye multitud de genes, se observa un mayor efecto en los genes de la familia *period* (*gper1a*, *gper2a* y *gper3*). De hecho, cuando el efecto más rápido de la ghrelina (1 h después del tratamiento) se ha extinguido prácticamente por completo, se observa una inducción más tardía de otro de los genes de la familia *per*, *gper1b*, que puede indicar una regulación diferencial de esta familia por parte de la ghrelina. Si bien en la actualidad no existen datos suficientes para poder concluir la relevancia o la consecuencia fisiológica de esta modulación diferencial.

Por otro lado, la presente Tesis Doctoral ha aumentado esta lista de hormonas incluyendo a los glucocorticoides. En este caso, se observa una mayor sensibilidad clara de los genes *per* en la respuesta a una señal de glucocorticoides ya que su inducción empieza mucho antes que el efecto de estas hormonas sobre los genes *gbma1a* y *gclock1a*. Esta mayor sensibilidad de los genes *per* a los glucocorticoides coincide con el hecho de que, como se ha comentado previamente, en el caso de los mamíferos se han encontrado sitios GRE en el promotor de estos genes (Reddy et al., 2007; Yamamoto et al., 2005).

Con respecto a las vías intracelulares capaces de modular los genes de la familia *period*, se ha demostrado que, al menos, la activación de la vía PLC-PKC es capaz de inducir un cambio en la expresión de los genes de esta familia, como se había detectado previamente para el gen *Per1* de humanos (Motzkus et al., 2000), si bien la vía del AMPc-PKA no parece implicada en su regulación a tiempos cortos (1 h), al contrario de lo observado en mamíferos (Motzkus et al., 2000; Yagita and Okamura, 2000) lo que sugiere una diferente regulación de los genes *Per* en los diferentes grupos de vertebrados.

Además, en teleósteos estos genes son sensibles igualmente a señales exógenas como la presencia de la luz (caso de *gper2a*; Azpeleta et al., 2012; Vatine et al., 2009; Vatine et al., 2011; Velarde et al., 2009; Vera et al., 2013) o el horario de alimentación (Feliciano et al., 2011; Nisembaum et al., 2012; Tinoco et al., 2014) en gran variedad de osciladores tanto centrales como periféricos incluyendo la retina, el techo óptico, el hipotálamo, el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, el intestino y el hígado, entre otros.

Asimismo, estos genes presentan de forma general amplitudes superiores al resto de los genes reloj del bucle principal en diferentes localizaciones como se muestra en el hígado del carpín en el caso de resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, y en otros osciladores de esta especie como el hipotálamo, la hipófisis y la cabeza del riñón (Azpeleta et al., 2012) así como en otras especies de teleósteos (López-Patiño et al., 2011) e incluso en

mamíferos (Peirson et al., 2006).

Todos estos datos podrían llevar a pensar que, a pesar de que otros genes reloj como *gbmal1a*, *gclock1a* y *grev-erba* sean sensibles a determinadas señales hormonales entre las que se encuentran la ghrelina y los glucocorticoides, los genes *per* al ser más sensibles, puedan ser capaces de detectar más rápidamente cambios en estas hormonas, siendo entonces la principal vía de entrada al sistema circadiano de estas señales. Sin embargo, todavía no se conoce la relevancia funcional de esta posible sensibilidad superior de los genes de la familia *per*, siendo necesarios estudios futuros en los que se analice en profundidad el significado fisiológico de una activación aguda de dichos genes así como la mayor amplitud de sus ritmos de expresión.

## 5. OBSERVACIONES FINALES

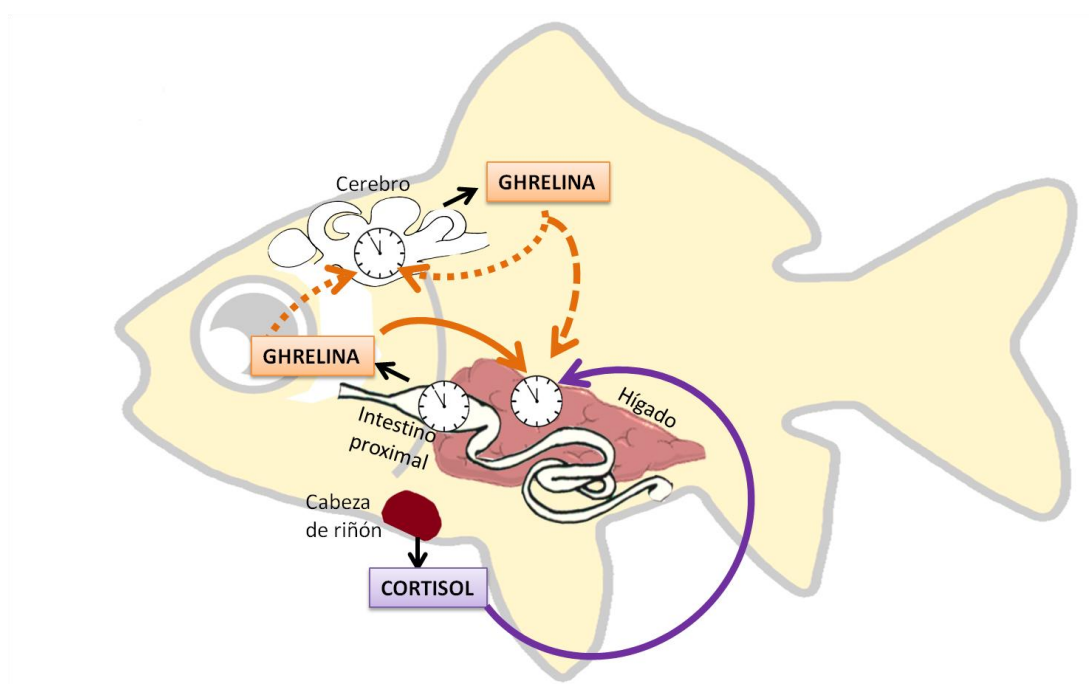
En la figura D10 se presenta un esquema de cómo estarían conectados diversos osciladores del sistema circadiano del carpín en función de todo lo discutido previamente. En conjunto, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han permitido en primer lugar el mapeo de multitud de osciladores funcionales en localizaciones centrales y periféricas incluyendo la hipófisis, el intestino anterior y el hígado. Asimismo, se ha estudiado su funcionalidad mediante el análisis del perfil diario del gen *gper1b*, mostrando que todos estos osciladores actúan en fase, con un máximo de expresión de este gen reloj en la fase oscura del fotociclo.

Por otro lado, se describe la distribución anatómica de una de las hormonas orexigénicas propuestas como vía de entrada al sistema circadiano, la ghrelina, y del gen de su receptor, *ghs-r1a*. Además, se analiza la ritmicidad de dos sistemas considerados como posibles moduladores de la expresión de genes reloj en el organismo: la ghrelina y el cortisol, observando en ambos casos (expresión de la *preproghrelina* y concentración plasmática de cortisol) el pico máximo durante la fase oscura, en fase con el gen reloj *gper1b*.

A continuación, se ha estudiado a ambas señales como posibles vías de entrada del oscilador hepático. En este sentido, ambas hormonas resultan efectivas en la modulación de los genes reloj en el hígado por lo que se puede llegar a un esquema como el presentado en la figura D9.

De esta manera, los datos de la presente Tesis Doctoral muestran transcritos de ghrelina tanto en su clásico lugar de síntesis, el tracto gastrointestinal, como en el hipotálamo. Esta ghrelina es capaz de modular la expresión de genes reloj hepáticos y, si bien los

resultados presentados no permiten detectar el origen de la ghrelina responsable de estos cambios, puede sugerirse como más probable el hecho de que sea ghrelina gastrointestinal debido a los bajos niveles detectados a nivel central que podrían tener una acción más local. Por otro lado, se ha descrito el efecto del cortisol de origen interrenal sobre los genes reloj hepáticos. Toda esta información permite establecer una teoría parcial sobre la comunicación entre osciladores en el carpín dorado, donde los datos presentados demuestran, al menos, una comunicación que implica las relaciones oscilador interrenal-oscilador hepático y oscilador gastrointestinal-oscilador hepático (Figura D10).



**Figura D10.** + En los resultados presentados aquí, se observa un perfil diario de la expresión del gen de la *preproghrelina* tanto a nivel tracto gastrointestinal como en localizaciones encefálicas. Debido a su presencia en los mismos núcleos cerebrales que el gen reloj *gper1b* podría considerarse como una vía de entrada al sistema circadiano (líneas naranjas punteadas). Asimismo, se ha demostrado su acción como reguladora de la expresión de los genes reloj del hígado en cultivo. Aunque no se haya demostrado en el presente trabajo, parece más sencillo pensar que la responsable de esta regulación será la ghrelina de origen gastrointestinal (línea naranja continua) que la escasa de origen encefálico (línea naranja discontinua). En el caso del cortisol de origen interrenal, la presente Tesis Doctoral demuestra su ritmicidad plasmática diaria y su acción como modulador y sincronizador de genes reloj en el hígado del carpín (línea morada).

## CONCLUSIONES







A partir de los resultados presentados y discutidos en la presente Tesis Doctoral, se proponen las siguientes conclusiones:

1. El gen *gper1b* se encuentra conservado en el carpín y se localiza en áreas del encéfalo anterior y medio, así como hipófisis, intestino anterior e hígado. Los ritmos diarios de *gper1b* encontrados en todos los tejidos estudiados, con acrofases coincidentes al final de la escotofase, si bien ligeramente adelantadas en el caso de los tejidos periféricos, demuestran que los relojes endógenos del carpín funcionan en fase. No hay evidencias que hagan pensar que en el carpín tenga un oscilador maestro (análogo al núcleo supraquiasmático de mamíferos) apoyando la idea de que en teleósteos el sistema circadiano está menos jerarquizado. Además las diferentes amplitudes de los ritmos diarios de *per1b* encontradas en los osciladores estudiados, sugieren que en cada órgano la magnitud de la respuesta a las señales rítmicas que los sincronizan es distinta.
2. Los resultados obtenidos demuestran la localización de la ghrelina (tanto del transcrito como del péptido) en tracto gastrointestinal del carpín, y han permitido describir por primera vez en teleósteos la distribución anatómica del transcrito del receptor GHS-R1a en cerebro anterior y medio, así como en el intestino proximal e hígado. El sistema ghrelinérgico, estudiado como una posible vía de comunicación entre osciladores, está presente en la mayor parte de las localizaciones centrales y periféricas donde previamente se detectó la expresión rítmica del gen reloj *gper1b*, respaldando la hipótesis de que esta hormona puede actuar como señal de entrada al sistema circadiano del carpín. En cerebro, tanto el receptor de ghrelina GHS-R1a como *gper1b* se expresan en localizaciones directamente relacionadas con áreas fotosensibles, áreas conectadas entre sí, y áreas donde se ha descrito presencia de sistemas reguladores de la ingesta y el balance energético, demostrando la conexión anatómica entre la homeostasis energética y el sistema circadiano.
3. Los ritmos encontrados por primera vez en teleósteos en el sistema ghrelinérgico en cerebro y tracto gastrointestinal del carpín, apoyan la idea de que tal y como se ha sugerido para otras hormonas, el sistema de ghrelina podría ser una salida del sistema circadiano.
4. En el hígado, los ritmos diarios de expresión de los genes reloj en animales aclimatados a fotoperiodo y horario de alimentación fijos, demuestran por primera vez en carpín, que

éste órgano puede actuar como un oscilador. Las acrofases de los elementos negativos están desplazadas aproximadamente 12 horas de las acrofases de los elementos positivos, lo cual es necesario para un correcto funcionamiento del reloj.

5. El funcionamiento del oscilador hepático tras 24 horas en cultivo *in vitro* se ve alterado, observándose una gran disminución de las amplitudes o incluso desaparición de los ritmos de los distintos genes reloj estudiados. Sólo se mantiene la ritmicidad del gen *gper1b* que es precisamente el que presenta la máxima amplitud *in vivo*. Esto sugiere que en las condiciones *in vitro* se pierden señales ambientales y/o sistémicas que mantendrían un acoplamiento intercelular en el animal vivo.
6. En este sentido, la ghrelina induce la expresión de todos los genes reloj analizados en el hígado del carpín *in vitro*, independientemente de si son elementos negativos (genes *period*), positivos (*gbmal1a* y *gclock1a*) o del bucle auxiliar (*grev-erba*). Esta acción está mediada a través de receptores específicos de ghrelina, pues se ve revertida en presencia de un antagonista ([D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6). Además, la ghrelina modula la expresión de estos genes reloj principalmente vía PLC-PKC, si bien la vía AC-PKA es responsable parcialmente de la regulación de *gbmal1a* y *grev-erba*.
7. La concentración plasmática de cortisol se eleva en la fase oscura, anticipando la llegada del alimento y la fotofase, lo que apoyaría la idea de que en teleósteos, como en mamíferos, los glucocorticoides podrían ser considerados las hormonas "del despertar", pues aumentan antes de la fase activa. El ritmo de cortisol está en fase con los ritmos de expresión de los genes *per1*. Teniendo en cuenta la ubiquidad de receptores de glucocorticoides, proponemos que tal como ocurre en mamíferos, en teleósteos estas hormonas podrían ser una señal sincronizadora de diversos osciladores centrales y/o periféricos.
8. El papel como señal temporal del cortisol, se avala con la demostración de que en el carpín, al menos en el oscilador hepático, los glucocorticoides inducen la expresión de *gper1a* y *gper1b* y reprimen *gbmal1a* y *gclock1a*, tanto *in vivo* como *in vitro*, sugiriendo que estas hormonas podrían sincronizar la fase del oscilador hepático. Estos resultados también avalan que la inducción de genes de la familia *per1* por glucocorticoides está conservada en la filogenia y podría estar mediada por la existencia de sitios GRE en el promotor de dichos genes reloj, previamente detectados en mamíferos. El mecanismo por

el cual se reprimen los elementos positivos aún no ha sido esclarecido, aunque proponemos que el mecanismo subyacente es independiente de la inducción de genes per.

9. Los ritmos de los genes reloj hepáticos perdidos tras 24 h en cultivo se restablecen con un pulso de 2 horas de dexametasona hasta al menos 48 horas después de la exposición al glucocorticoide. No obstante, la amplitud obtenida tras el pulso es drásticamente menor que la observada en condiciones *in vivo*, lo que indica que, aunque muy importante, no es la única señal reguladora del oscilador hepático.
10. Como conclusión general, podemos proponer que el sistema circadiano del carpín, se encuentra formado por múltiples osciladores localizados por todo el organismo que trabajan al unísono de manera sincronizada y en fase, sin haberse localizado hasta el momento un oscilador maestro. Los resultados muestran que el hígado en esta especie de teleósteo es muy sensible a señales procedentes de diferentes localizaciones del organismo, incluyendo al menos la interrenal (glucocorticoides) y el tracto gastrointestinal (ghrelina), y ponen de manifiesto la relevancia de este modelo experimental para entender cómo se realiza la comunicación entre el sistema endocrino y el sistema circadiano para el mantenimiento de la homeostasis temporal en el organismo.



## CONCLUSIONS





From the results presented and discussed in this PhD thesis, the following conclusions are proposed:

1. The *gper1b* gene is conserved in goldfish and is located in anterior and middle areas of the brain, pituitary, liver and foregut. The daily rhythms of *gper1b* found in all tissues studied, with acrophases at the end of the scotophase although slightly advanced in the case of peripheral tissues, demonstrate that endogenous clocks of goldfish operate in phase. There is no evidence for believing that the goldfish has a master oscillator (analogous to the mammalian suprachiasmatic nucleus) supporting the idea that the circadian system in teleost is less hierarchical than the mammalian one. Furthermore, the different amplitudes of the daily *gper1b* rhythms observed in the oscillators studied suggest that the magnitude of response to the rhythmic signals is different in each organ.
2. Results show the location of ghrelin (both transcript and peptide) in the gastrointestinal tract of goldfish, and allowed to describe for the first time in teleosts the anatomical distribution of GHS-R1a transcript in anterior and middle brain, proximal intestine and liver. The ghrelinergic system, studied as a possible communicative pathway among oscillators, is present in most of the central and peripheral locations where *gper1b* rhythmic expression was previously detected, supporting the hypothesis that this hormone can act as an input to the circadian system in goldfish. In the brain, both *ghs-r1a* and *gper1b* are situated in areas directly related to photosensitive locations, areas connected to each other, and areas where the presence of systems that regulate food intake and energy balance has been described, demonstrating the anatomical connection between energy homeostasis and the circadian system.
3. The rhythms found for the first time in teleosts in the ghrelinergic system in brain and gastrointestinal tract of goldfish, support the idea that the ghrelin system could be acting as an output of the circadian system, as it has been suggested for other hormones.
4. In the liver, the daily rhythms in clock gene expression observed in animals acclimated to a light:dark photoperiod and scheduled feeding time demonstrate, for the first time in goldfish, that this tissue can act as an oscillator. The acrophases of the negative elements are shifted by around 12 hours from the acrophases of the positive elements, which is necessary for the proper operation of the clock.



5. The hepatic oscillator functioning after 24 hours *in vitro* is altered, showing a large decrease in the amplitudes or even the disappearance of the rhythms of the different clock genes studied. Only the rhythmicity of *gper1b* gene, the one with the maximum amplitude *in vivo*, is maintained. This suggests that, in *in vitro* conditions, the environmental and / or systemic signals that would keep an intercellular coupling in the living animal are lost.
6. In this regard, ghrelin induces the expression of all the clock genes analyzed in goldfish liver *in vitro*, regardless of whether they are negative elements (*period*), positive (*gbmal1a* and *gclock1a*) or part of the auxiliary loop (*grev-erba*). This action is mediated through specific ghrelin receptors, as is reversed in the presence of an antagonist ([D-Lys3] -GHRP-6). Moreover, ghrelin modulates the expression of these clock genes mainly via the PLC-PKC pathway, although the AC-PKA pathway is partially responsible for regulating *gbmal1a* and *grev-erba*.
7. The plasmatic concentration of cortisol rises in the dark phase, anticipating the arrival of food and photophase, which would support the idea that in teleosts, as in mammals, glucocorticoid hormones could be considered as the "awakening hormones" as they increase before the active phase. The rhythm of cortisol is in phase with the expression rhythms of *per1* genes. Given the ubiquity of glucocorticoid receptors, we propose that in teleosts, as in mammals, these hormones may be a timing signal for various central and / or peripheral oscillators.
8. The role of cortisol as a temporal signal is reinforced by the observation that glucocorticoids induce the expression of *gper1a* and *gper1b* and suppress *gbmal1a* and *gclock1a* in goldfish, at least in the liver oscillator, both *in vivo* and *in vitro*, suggesting that these hormones may synchronize the phase of the hepatic oscillator. These results also support that the induction of *per1* genes family by glucocorticoid is conserved in the phylogeny and may be mediated by the existence of GRE sites in the promoter of these clock genes, as previously detected in mammals. The mechanism by which the positive elements are suppressed has not yet been clarified, but we suggest that the underlying mechanism is independent of *per* genes induction.
9. The rhythms of clock genes lost in liver after 24 h in culture are reset with a 2 hour-pulse of dexamethasone until at least 48 hours after the exposure to the glucocorticoid.

However, the amplitude obtained after the pulse is drastically lower than the one observed *in vivo*, indicating that glucocorticoids, although are very important signals, are not the only regulatory signal for the hepatic oscillator.

10. As a general conclusion, we propose that the circadian system of goldfish consists of multiple oscillators located throughout the body that work synchronously and in phase, without having been detected to date a master oscillator. Results show that, in this teleost species, the liver is very sensitive to signals from different areas of the body, including at least the interrenal (glucocorticoids) and gastrointestinal tract (ghrelin), and underline the importance of this experimental model to understand how the endocrine system and the circadian system are communicated in order to maintain the temporarily homeostasis in the body.



## BIBLIOGRAFÍA





- Abe, K., Kroning, J., Greer, M. A. y Critchlow, V.** (1979). Effects of destruction of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythms in plasma corticosterone, body temperature, feeding and plasma thyrotropin. *Neuroendocrinology* **29**, 119–131.
- Abe, M., Herzog, E. D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M. y Block, G. D.** (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neurosci.* **22**, 350–356.
- Abizaid, A. y Horvath, T. L.** (2012). Ghrelin and the central regulation of feeding and energy balance. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **16**, S617–626.
- Abizaid, A., Liu, Z.-W., Andrews, Z. B., Shanabrough, M., Borok, E., Elsworth, J. D., Roth, R. H., Sleeman, M. W., Picciotto, M. R., Tschöp, M. H., et al.** (2006). Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clin. Invest.* **116**, 3229–3239.
- Ackermann, D., Vogt, B., Escher, G., Dick, B., Reichen, J., Frey, B. M. y Frey, F. J.** (1999). Inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase by bile acids in rats with cirrhosis. *Hepatol. Baltim. Md* **30**, 623–629.
- Adamah-Biassi, E. B., Zhang, Y., Jung, H., Vissapragada, S., Miller, R. J. y Dubocovich, M. I.** (2014). Distribution of MT1 melatonin receptor promoter-driven RFP expression in the brains of BAC C3H/HeN transgenic mice. *J. Histochem. Cytochem.* **62**, 70–84.
- Albrecht, U.** (2012). Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* **74**, 246–260.
- Alléra, A. y Wildt, L.** (1992). Glucocorticoid-recognizing and -effector sites in rat liver plasma membrane. Kinetics of corticosterone uptake by isolated membrane vesicles--I. Binding and transport. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **42**, 737–756.
- Alsop, D. y Vijayan, M. M.** (2009). Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **153**, 49–54.
- Aluru, N. y Vijayan, M. M.** (2009). Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. *Gen. Comp. Endocrinol.* **164**, 142–150.
- Amir, S., Lamont, E. W., Robinson, B. y Stewart, J.** (2004). A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Neurosci.* **24**, 781–790.
- Amole, N. y Unniappan, S.** (2009). Fasting induces preproghrelin mRNA expression in the brain and gut of zebrafish, *Danio rerio*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **161**, 133–137.
- Andrews, Z. B., Liu, Z.-W., Wallingford, N., Erion, D. M., Borok, E., Friedman, J. M., Tschöp, M. H., Shanabrough, M., Cline, G., Shulman, G. I., et al.** (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* **454**, 846–851.
- Appa Rao, N. V., Raza, B., Prasad, J. K., Razi, S. S., Gottardo, L., Ahmad, M. F. y Nussdorfer, G. G.** (2001). Melatonin decreases glucocorticoid blood concentration in the rat and palm squirrel, acting directly on the adrenal gland. *Biomed. Res.* **22**, 115–117.
- Arcamone, N., Neglia, S., Gargiulo, G., Esposito, V., Varricchio, E., Battaglini, P., De Girolamo, P. y Russo, F.** (2009). Distribution of ghrelin peptide in the gastrointestinal tract of stomachless and stomach-containing teleosts. *Microsc. Res. Tech.* **72**, 525–533.

- Arellanes-Licea, E. C., Báez-Ruiz, A., Carranza, M. E., Arámburo, C., Luna, M. y Díaz-Muñoz, M.** (2014). Daily Patterns and Adaptation of the Ghrelin, Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-1 System Under Daytime Food Synchronisation in Rats. *J. Neuroendocrinol.* **26**, 282–295.
- Arendt, J. y Skene, D. J.** (2005). Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* **9**, 25–39.
- Armstrong, S. M., Cassone, V. M., Chesworth, M. J., Redman, J. R. y Short, R. V.** (1986). Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J. Neural Transm. Suppl.* **21**, 375–394.
- Arosio, M., Ronchi, C. L., Gebbia, C., Cappiello, V., Beck-Peccoz, P. y Peracchi, M.** (2003). Stimulatory effects of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 701–704.
- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Yuzuriha, H., Nagata, T., Ueno, N., Makino, S., Fujimiya, M., Nijima, A., Fujino, M. A., et al.** (2001a). Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* **120**, 337–345.
- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Yuzuriha, H., Nagata, T., Fujimiya, M., Katsuura, G., Makino, S., Fujino, M. A. y Kasuga, M.** (2001b). A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology* **74**, 143–147.
- Asakawa, A., Inui, A., Fujimiya, M., Sakamaki, R., Shinfuku, N., Ueta, Y., Meguid, M. M. y Kasuga, M.** (2005). Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* **54**, 18–24.
- Aschoff, J.** (1981). A survey on biological rhythms. In *Biological Rhythms* (ed. Aschoff, J.), pp. 3–10. Springer US.
- Ashe, J. y Bushara, K.** (2014). The olivo-cerebellar system as a neural clock. *Adv. Exp. Med. Biol.* **829**, 155–165.
- Ayson, F. G. y Takemura, A.** (2006). Daily expression patterns for mRNAs of GH, PRL, SL, IGF-I and IGF-II in juvenile rabbitfish, *Siganus guttatus*, during 24-h light and dark cycles. *Gen. Comp. Endocrinol.* **149**, 261–268.
- Azhar, S., Leers-Sucheta, S. y Reaven, E.** (2003). Cholesterol uptake in adrenal and gonadal tissues: the SR-BI and “selective” pathway connection. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **8**, s998–1029.
- Azpeleta, C.** (2013). *Melatonina en la regulación de las respuestas al estrés en teleósteos. Efectos comportamentales y acciones en el eje hipotálamo-hipófisis-interrenal*. Madrid: Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Azpeleta, C., Martínez-Alvarez, R. M., Delgado, M. J., Isorna, E. y De Pedro, N.** (2010). Melatonin reduces locomotor activity and circulating cortisol in goldfish. *Horm. Behav.* **57**, 323–329.
- Azpeleta, C., Sánchez-Bretaña, A., Isorna, E., Nisembaum, L., Velarde, E. y De Pedro, N.** (2012). Understanding the circadian system as a net of clocks: daily expression of clock genes in the hypothalamus–pituitary–interrenal axis in *Carassius auratus*. In *Avances en endocrinología comparada VI* (ed. Delgado, María Jesús, Alonso-Gómez, Ángel Luis, de Pedro, Nuria, and Isorna, Esther, pp. 37–40. Madrid: Servicio de Publicaciones de la Universidad Complutense de Madrid.
- Balakrishnan, A., Stearns, A. T., Ashley, S. W., Tavakkolizadeh, A. y Rhoads, D. B.** (2010). Restricted feeding phase shifts clock gene and sodium glucose cotransporter 1 (SGLT1) expression in rats. *J. Nutr.* **140**, 908–914.

- Balakrishnan, A., Tavakkolizadeh, A. y Rhoads, D. B. (2012). Circadian clock genes and implications for intestinal nutrient uptake. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 417–422.
- Balm, P. H. M. y Pottinger, T. G. (1993). Acclimation of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) to low environmental pH does not involve an activation of the pituitary-interrenal axis, but evokes adjustments in branchial ultrastructure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**, 2532–2541.
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schütz, G. y Schibler, U. (2000a). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* **289**, 2344–2347.
- Barazzoni, R., Bosutti, A., Stebel, M., Cattin, M. R., Roder, E., Visintin, L., Cattin, L., Biolo, G., Zanetti, M. y Guarnieri, G. (2005). Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**, E228–235.
- Barclay, J. L., Tsang, A. H. y Oster, H. (2012). Chapter 10 - Interaction of central and peripheral clocks in physiological regulation. In *Progress in Brain Research* (ed. Andries Kalsbeek, M. M., Till Roenneberg and Russell G. Foster), pp. 163–181. Elsevier.
- Barnes, P. J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **1979** **94**, 557–572.
- Bass, J. y Takahashi, J. S. (2010). Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* **330**, 1349–1354.
- Batten, T. F. y Ball, J. N. (1976). Circadian changes in prolactin cell activity in the pituitary of the teleost *Poecilia latipinna* in freshwater. *Cell Tissue Res.* **165**, 267–280.
- Baudet, M.-L. y Harvey, S. (2003). Ghrelin-induced GH secretion in domestic fowl *in vivo* and *in vitro*. *J. Endocrinol.* **179**, 97–105.
- Bayarri, M. J., Muñoz-Cueto, J. A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Rol de Lama, M. A., Madrid, J. A. y Sánchez-Vázquez, F. J. (2004a). Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Physiol. Behav.* **81**, 577–583.
- Bayarri, M. J., Iigo, M., Muñoz-Cueto, J. A., Isorna, E., Delgado, M. J., Madrid, J. A., Sánchez-Vázquez, F. J. y Alonso-Gómez, A. L. (2004b). Binding characteristics and daily rhythms of melatonin receptors are distinct in the retina and the brain areas of the European sea bass retina (*Dicentrarchus labrax*). *Brain Res.* **1029**, 241–250.
- Bayliss, J. A. y Andrews, Z. B. (2013). Ghrelin is neuroprotective in Parkinson's disease: molecular mechanisms of metabolic neuroprotection. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* **4**, 25–36.
- Bechtold, D. A. (2008). Energy-responsive timekeeping. *J. Genet.* **87**, 447–458.
- Becquet, D., Boyer, B., Rasolonjanahary, R., Brue, T., Guillen, S., Moreno, M., Franc, J.-L. y François-Bellan, A.-M. (2014). Evidence for an internal and functional circadian clock in rat pituitary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **382**, 888–898.
- Bedont, J. L. y Blackshaw, S. (2015). Constructing the suprachiasmatic nucleus: a watchmaker's perspective on the central clockworks. *Front. Syst. Neurosci.* **9**.
- Belle, M. D. C., Hughes, A. T. L., Bechtold, D. A., Cunningham, P., Pierucci, M., Burdakov, D. y Piggins, H. D. (2014). Acute suppressive and long-term phase modulation actions of orexin on the mammalian circadian clock. *J. Neurosci.* **34**, 3607–3621.



- Bennett, P. A., Thomas, G. B., Howard, A. D., Feighner, S. D., van der Ploeg, L. H., Smith, R. G. y Robinson, I. C. (1997). Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology* **138**, 4552–4557.
- Benso, A., Calvi, E., Gramaglia, E., Olivetti, I., Tomelini, M., Ghigo, E. y Broglio, F. (2013). Other than growth hormone neuroendocrine actions of ghrelin. *Endocr. Dev.* **25**, 59–68.
- Benyassi, A., Schwartz, C., Ducouret, B. y Falcón, J. (2001). Glucocorticoid receptors and serotonin N-acetyltransferase activity in the fish pineal organ. *Neuroreport* **12**, 889–892.
- Bernier, N. J., Lin, X. y Peter, R. E. (1999). Differential expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and urotensin I precursor genes, and evidence of CRF gene expression regulated by cortisol in goldfish brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* **116**, 461–477.
- Berthoud, H.-R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **26**, 393–428.
- Bertram, R., Helena, C. V., Gonzalez-Iglesias, A. E., Tabak, J. y Freeman, M. E. (2010). A tale of two rhythms: the emerging roles of oxytocin in rhythmic prolactin release. *J. Neuroendocrinol.* **22**, 778–784.
- Blum, I. D., Patterson, Z., Khazall, R., Lamont, E. W., Sleeman, M. W., Horvath, T. L. y Abizaid, A. (2009). Reduced anticipatory locomotor responses to scheduled meals in ghrelin receptor deficient mice. *Neuroscience* **164**, 351–359.
- Blum, I. D., Lamont, E. W. y Abizaid, A. (2012). Competing clocks: Metabolic status moderates signals from the master circadian pacemaker. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **36**, 254–270.
- Bodosi, B., Gardi, J., Hajdu, I., Szentirmai, E., Obal, F. y Krueger, J. M. (2004). Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287**, R1071–1079.
- Boeuf, G. y Le Bail, P.-Y. (1999). Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* **177**, 129–152.
- Borski, R. J., Helms, L. M., Richman, N. H. y Grau, E. G. (1991). Cortisol rapidly reduces prolactin release and cAMP and  $45\text{Ca}^{2+}$  accumulation in the cichlid fish pituitary *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2758–2762.
- Borski, R. J. (2000). Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 427–436.
- Bosler, O., Girardet, C., Franc, J.-L., Becquet, D. y François-Bellan, A.-M. (2015). Structural plasticity of the circadian timing system. An overview from flies to mammals. *Front. Neuroendocrinol.* **38**, 50–64.
- Bozek, K., Relógio, A., Kielbasa, S. M., Heine, M., Dame, C., Kramer, A. y Herzog, H. (2009). Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PLoS One* **4**, e4882.
- Braasch, I. y Postlethwait, J. H. (2012). Polyploidy in fish and the teleost genome duplication. In *Polyploidy and genome evolution* (ed. Soltis, P. S.) and Soltis, D. E.), pp. 341–383. Springer Berlin Heidelberg.
- Brancaccio, M., Enoki, R., Mazuski, C. N., Jones, J., Evans, J. A. y Azzi, A. (2014). Network-mediated encoding of circadian time: the suprachiasmatic nucleus (SCN) from genes to neurons to circuits, and back. *J. Neurosci.* **34**, 15192–15199.

- Breves, J. P., Veillette, P. A. y Specker, J. L. (2009). Ghrelin in the summer flounder: immunolocalization to the gastric glands and action on plasma cortisol levels. *Comp. Biochem. Physiol. A*. **152**, 268–272.
- Briggs, D. I. y Andrews, Z. B. (2011). Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis. *Neuroendocrinology* **93**, 48–57.
- Broglio, F., Koetsveld Pv, P. van, Benso, A., Gottero, C., Prodam, F., Papotti, M., Muccioli, G., Gauna, C., Hofland, L., Deghenghi, R., et al. (2002). Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 4829–4832.
- Brown, C. L. y Kim, B. G. (1995). Combined application of cortisol and triiodothyronine in the culture of larval marine finfish. *Aquaculture* **135**, 79–86.
- Brown, S. A., Zumbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N. y Schibler, U. (2002). Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr. Biol. CB* **12**, 1574–1583.
- Bruce, V. G. (1972). Mutants of the biological clock in *Chlamydomonas reinhardi*. *Genetics* **70**, 537–548.
- Buhr, E. D. y Takahashi, J. S. (2013). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb. Exp. Pharmacol.* 3–27.
- Bury, N. R., Sturm, A., Rouzic, P. L., Lethimonier, C., Ducouret, B., Guiguen, Y., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V., Rafestin-Oblin, M. E. y Prunet, P. (2003). Evidence for two distinct functional glucocorticoid receptors in teleost fish. *J. Mol. Endocrinol.* **31**, 141–156.
- Bury, N. R. y Sturm, A. (2007). Evolution of the corticosteroid receptor signalling pathway in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **153**, 47–56.
- Cahill, G. M. y Besharse, J. C. (1993). Circadian clock functions localized in xenopus retinal photoreceptors. *Neuron* **10**, 573–577.
- Cahill, G. M. (2002). Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.* **309**, 27–34.
- Cambras Riu, T. (2006). Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos. In *Cronobiología básica y clínica*, pp. 151–189. Madrid, España: Editec@Red.
- Camiaña, J. P., Carreira, M. C., El Messari, S., Llorens-Cortes, C., Smith, R. G. y Casanueva, F. F. (2004). Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology* **145**, 930–940.
- Carlini, V. P., Gaydou, R. C., Schiöth, H. B. y de Barioglio, S. R. (2007). Selective serotonin reuptake inhibitor (fluoxetine) decreases the effects of ghrelin on memory retention and food intake. *Regul. Pept.* **140**, 65–73.
- Carneiro, B. T. S. y Araujo, J. F. (2009). The food-entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals? *Chronobiol. Int.* **26**, 1273–1289.
- Caro, J. F. y Amatruda, J. M. (1982). Glucocorticoid-induced insulin resistance: the importance of postbinding events in the regulation of insulin binding, action, and degradation in freshly isolated and primary cultures of rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.* **69**, 866–875.
- Carraro, G., Albertin, G., Abudukerimu, A., Aragona, F. y Nussdorfer, G. G. (2004). Growth hormone secretagogue receptor subtypes 1a and 1b are expressed in the human adrenal cortex. *Int. J. Mol. Med.* **13**, 295–298.

- Cavallari, N., Frigato, E., Vallone, D., Fröhlich, N., Lopez-Olmeda, J. F., Foà, A., Berti, R., Sánchez-Vázquez, F. J., Bertolucci, C. y Foulkes, N. S.** (2011). A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *PLoS Biol* **9**, e1001142.
- Cerdá-Reverter, J. M., Zanut, S., Carrillo, M. y Madrid, J. A.** (1998). Time-course studies on plasma glucose, insulin, and cortisol in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. *Physiol. Behav.* **64**, 245–250.
- Cermakian, N., Whitmore, D., Foulkes, N. S. y Sassone-Corsi, P.** (2000). Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4339–4344.
- Challet, E.** (2013). Circadian clocks, food intake and metabolism. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **119**, 105–135.
- Chan, S. W. y Callard, I. P.** (1972). Circadian rhythm in the secretion of corticosterone by the desert iguana, *Dipsosaurus dorsalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **18**, 565–568.
- Chan, C.-B. y Cheng, C. H. K.** (2004). Identification and functional characterization of two alternatively spliced growth hormone secretagogue receptor transcripts from the pituitary of black seabream *Acanthopagrus schlegelii*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **214**, 81–95.
- Chan, C. B., Fung, C. K., Fung, W., Tse, M. C. L. y Cheng, C. H. K.** (2004). Stimulation of growth hormone secretion from seabream pituitary cells in primary culture by growth hormone secretagogues is independent of growth hormone transcription. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* **139**, 77–85.
- Chen, C.-Y., Asakawa, A., Fujimiya, M., Lee, S.-D. y Inui, A.** (2009). Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol. Rev.* **61**, 430–481.
- Cheng, M. Y., Bullock, C. M., Li, C., Lee, A. G., Bermak, J. C., Belluzzi, J., Weaver, D. R., Leslie, F. M. y Zhou, Q.-Y.** (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* **417**, 405–410.
- Chen, T., Tang, Z., Yan, A., Li, W. y Lin, H.** (2008). Molecular cloning and mRNA expression analysis of two GH secretagogue receptor transcripts in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *J. Endocrinol.* **199**, 253–265.
- Chen, X., Ge, Y.-L., Jiang, Z.-Y., Liu, C.-Q., Depoortere, I. y Peeters, T. L.** (2005). Effects of ghrelin on hypothalamic glucose responding neurons in rats. *Brain Res.* **1055**, 131–136.
- Cherrington, A. D.** (1999). Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver *in vivo*. *Diabetes* **48**, 1198–1214.
- Chong, N. W., Chaurasia, S. S., Haque, R., Klein, D. C. y Iuvone, P. M.** (2003). Temporal-spatial characterization of chicken clock genes: circadian expression in retina, pineal gland, and peripheral tissues. *J. Neurochem.* **85**, 851–860.
- Chow, K. B. S., Sun, J., Man Chu, K., Tai Cheung, W., Cheng, C. H. K. y Wise, H.** (2012). The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* **348**, 247–254.
- Chrousos, G. P.** (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1351–1362.

- Chrousos, G. P. y Kino, T.** (2005). Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci. Signal.* **2005**, pe48–pe48.
- Chu, A., Zhu, L., Blum, I. D., Mai, O., Leliavski, A., Fahrenkrug, J., Oster, H., Boehm, U. y Storch, K.-F.** (2013). Global but not gonadotrope-specific disruption of *Bmal1* abolishes the luteinizing hormone surge without affecting ovulation. *Endocrinology* **154**, 2924–2935.
- Chung, S., Son, G. H. y Kim, K.** (2011). Adrenal peripheral oscillator in generating the circadian glucocorticoid rhythm. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1220**, 71–81.
- Cockrem, J. F.** (2013). Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *Gen. Comp. Endocrinol.* **181**, 45–58.
- Colwell, C. S.** (2011). Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 553–569.
- Coomans, C. P., Ramkisoensing, A. y Meijer, J. H.** (2015). The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Front. Neuroendocrinol.* **37**, 29–42.
- Coutinho, A. E. y Chapman, K. E.** (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol. Cell. Endocrinol.* **335**, 2–13.
- Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., Strasburger, C. J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M. L., et al.** (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* **37**, 649–661.
- Cravedi, J. P., Delous, G., Debrauwer, L. y Prome, D.** (1993). Biotransformation and branchial excretion of 17 alpha-methyltestosterone in trout. *Drug Metab. Dispos.* **21**, 377–385.
- Cruz, S. A., Tseng, Y.-C., Kaiya, H. y Hwang, P. P.** (2010). Ghrelin affects carbohydrate-glycogen metabolism via insulin inhibition and glucagon stimulation in the zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **156**, 190–200.
- Cui, C., Ohnuma, H., Daimon, M., Susa, S., Yamaguchi, H., Kameda, W., Jimbu, Y., Oizumi, T. y Kato, T.** (2008). Ghrelin infused into the portal vein inhibits glucose-stimulated insulin secretion in Wistar rats. *Peptides* **29**, 1241–1246.
- Cummings, D. E., Purnell, J. Q., Frayo, R. S., Schmidova, K., Wisse, B. E. y Weigle, D. S.** (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* **50**, 1714–1719.
- Currie, P. J., Mirza, A., Fuld, R., Park, D. y Vasselli, J. R.** (2005). Ghrelin is an orexigenic and metabolic signaling peptide in the arcuate and paraventricular nuclei. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, R353–R358.
- Dallman, M. F., Akana, S. F., Jacobson, L., Levin, N., Cascio, C. S. y Shinsako, J.** (1987). Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **512**, 402–414.
- Damian, M., Marie, J., Leyris, J.-P., Fehrentz, J.-A., Verdié, P., Martinez, J., Banères, J.-L. y Mary, S.** (2012). High constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: a study with a functional monomeric GHS-R1A receptor reconstituted in lipid discs. *J. Biol. Chem.* **287**, 3630–3641.

- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F. y Schibler, U.** (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* **14**, 2950–2961.
- Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., Sakurai, T., Yanagisawa, M. y Nakazato, M.** (1999). Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 748–753.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M. S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K. y Nakazato, M.** (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* **141**, 4255–4261.
- Date, Y., Murakami, N., Toshinai, K., Matsukura, S., Nijima, A., Matsuo, H., Kangawa, K. y Nakazato, M.** (2002). The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* **123**, 1120–1128.
- Davidson, A. J. y Stephan, F. K.** (1999). Plasma glucagon, glucose, insulin, and motilin in rats anticipating daily meals. *Physiol. Behav.* **66**, 309–315.
- Davidson, A. J., Poole, A. S., Yamazaki, S. y Menaker, M.** (2003). Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav.* **2**, 32–39.
- Davie, A., Minghetti, M. y Migaud, H.** (2009). Seasonal variations in clock-gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Chronobiol. Int.* **26**, 379–395.
- De Jesus, E. G., Inui, Y. y Hirano, T.** (1990). Cortisol enhances the stimulating action of thyroid hormones on dorsal fin-ray resorption of flounder larvae *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **79**, 167–173.
- De Kloet, E. R.** (2000). Stress in the brain. *Eur. J. Pharmacol.* **405**, 187–198.
- De Kloet, E. R., Joëls, M. y Holsboer, F.** (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 463–475.
- Della Ragione, F., Comitato, R., Angelini, F., D'Esposito, M. y Cardone, A.** (2005). Molecular cloning and characterization of the clock gene *period2* in the testis of lizard *Podarcis sicula* and its expression during seasonal reproductive cycle. *Gene* **363**, 105–112.
- Delporte, C.** (2013). Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica* **2013**, 518309.
- Del Pozo, A., Vera, L. M., Sánchez, J. A. y Sánchez-Vázquez, F. J.** (2012). Molecular cloning, tissue distribution and daily expression of *cry1* and *cry2* clock genes in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol. A.* **163**, 364–371.
- De Pedro, N., Alonso-Gómez, A. L., Gancedo, B., Valenciano, A. I., Delgado, M. J. y Alonso-Bedate, M.** (1997). Effect of alpha-helical-CRF[9-41] on feeding in goldfish: involvement of cortisol and catecholamines. *Behav. Neurosci.* **111**, 398–403.
- Depoortere, I.** (2009). Targeting the ghrelin receptor to regulate food intake. *Regul. Pept.* **156**, 13–23.
- De Vriese, C., Gregoire, F., Lema-Kisoka, R., Waelbroeck, M., Robberecht, P. y Delporte, C.** (2004). Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* **145**, 4997–5005.
- De Vriese, C., Hacquebard, M., Gregoire, F., Carpentier, Y. y Delporte, C.** (2007). Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. *Endocrinology* **148**, 2355–2362.

- Dezaki, K., Hosoda, H., Kakei, M., Hashiguchi, S., Watanabe, M., Kangawa, K. y Yada, T. (2004). Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca<sup>2+</sup> signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes* **53**, 3142–3151.
- Dezaki, K., Kakei, M. y Yada, T. (2007). Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K<sup>+</sup> channels to attenuate glucose-induced Ca<sup>2+</sup> signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes* **56**, 2319–2327.
- Dhabhar, F. S., Miller, A. H., McEwen, B. S. y Spencer, R. L. (1995). Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md.* **154**, 5511–5527.
- Dibner, C., Schibler, U. y Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 517–549.
- Dibner, C. y Schibler, U. (2015). Circadian timing of metabolism in animal models and humans. *J. Intern. Med.* **277**, 513–527.
- Di Cara, F. y King-Jones, K. (2013). How clocks and hormones act in concert to control the timing of insect development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **105**, 1–36.
- Dickmeis, T., Lahiri, K., Nica, G., Vallone, D., Santoriello, C., Neumann, C. J., Hammerschmidt, M. y Foulkes, N. S. (2007). Glucocorticoids play a key role in circadian cell cycle rhythms. *PLoS Biol* **5**, e78.
- Dickmeis, T. (2009). Glucocorticoids and the circadian clock. *J. Endocrinol.* **200**, 3–22.
- Dickmeis, T. y Foulkes, N. S. (2011). Glucocorticoids and circadian clock control of cell proliferation: at the interface between three dynamic systems. *Mol. Cell. Endocrinol.* **331**, 11–22.
- Dickmeis, T., Weger, B. D. y Weger, M. (2013). The circadian clock and glucocorticoids—interactions across many time scales. *Mol. Cell. Endocrinol.* **380**, 2–15.
- Dickson, S. L. y Luckman, S. M. (1997). Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology* **138**, 771–777.
- Divertie, G. D., Jensen, M. D. y Miles, J. M. (1991). Stimulation of lipolysis in humans by physiological hypercortisolemia. *Diabetes* **40**, 1228–1232.
- Domínguez, L., Morona, R., Joven, A., González, A. y López, J. M. (2010). Immunohistochemical localization of orexins (hypocretins) in the brain of reptiles and its relation to monoaminergic systems. *J. Chem. Neuroanat.* **39**, 20–34.
- Dores, R. M. y Liang, L. (2014). Analyzing the activation of the melanocortin-2 receptor of tetrapods. *Gen. Comp. Endocrinol.* **203**, 3–9.
- Doyon, C., Leclair, J., Trudeau, V. L. y Moon, T. W. (2006). Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y mRNA levels are modified by glucocorticoids in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **146**, 126–135.
- Duez, H. y Staels, B. (2009). *Rev-erba*: an integrator of circadian rhythms and metabolism. *J. Appl. Physiol.* **107**, 1972–1980.
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**, 271–290.

- Dupont, W., Bourgeois, P., Reinberg, A. y Vaillant, R. (1979). Circannual and circadian rhythms in the concentration of corticosterone in the plasma of the edible frog (*Rana esculenta* L.). *J. Endocrinol.* **80**, 117–125.
- Eckel-Mahan, K. y Sassone-Corsi, P. (2013). Metabolism and the circadian clock converge. *Physiol. Rev.* **93**, 107–135.
- Ekström, P. y Meissl, H. (1997). The pineal organ of teleost fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* **7**, 199–284.
- Eom, J., Hong, A., Kang, Y.-H., Yoo, H.-J., Chang, E.-J., Kang, S.-W., Yoon, S.-Y., Kim, S.-Y. y Song, Y. (2014). Molecular cloning, regulation, and functional analysis of two GHS-R genes in zebrafish. *Exp. Cell Res.* **326**, 10–21.
- Espelid, S., Løkken, G. B., Steiro, K. y Bøgwald, J. (1996). Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **6**, 95–110.
- Evans, S. J., Murray, T. F. y Moore, F. L. (2000). Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **72**, 209–221.
- Evans, J. A., Leise, T. L., Castanon-Cervantes, O. y Davidson, A. J. (2015). Neural correlates of individual differences in circadian behaviour. *Proc. Biol. Sci.* **282**,.
- Facciolo, R. M., Crudo, M., Giusi, G. y Canonaco, M. (2010). GABAergic influences on ORX receptor-dependent abnormal motor behaviors and neurodegenerative events in fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **243**, 77–86.
- Facciolo, R. M., Crudo, M., Zizza, M., Giusi, G. y Canonaco, M. (2012).  $\alpha$  GABA(A) subunit-orexin receptor interactions activate learning/motivational pathways in the goldfish. *Behav. Brain Res.* **234**, 349–356.
- Fahrenkrug, J., Georg, B., Hannibal, J., Hindersson, P. y Gräs, S. (2006). Diurnal rhythmicity of the clock genes *Per1* and *Per2* in the rat ovary. *Endocrinology* **147**, 3769–3776.
- Falcón, J. (1999). Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog. Neurobiol.* **58**, 121–162.
- Falcón, J., Gothilf, Y., Coon, S. L., Boeuf, G. y Klein, D. C. (2003). Genetic, temporal and developmental differences between melatonin rhythm generating systems in the teleost fish pineal organ and retina. *J. Neuroendocrinol.* **15**, 378–382.
- Falcón, J., Besseau, L., Sauzet, S. y Boeuf, G. (2007). Melatonin effects on the hypothalamo–pituitary axis in fish. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**, 81–88.
- Falcón, J., Besseau, L., Fuentès, M., Sauzet, S., Magnanou, E. y Boeuf, G. (2009). Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1163**, 101–111.
- Falcón, J., Migaud, H., Muñoz-Cueto, J. A. y Carrillo, M. (2010). Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **165**, 469–482.
- Feldman, J. F. y Hoyle, M. N. (1973). Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* **75**, 605–613.
- Feliciano, A., Vivas, Y., de Pedro, N., Delgado, M. J., Velarde, E. y Isorna, E. (2011). Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J. Biol. Rhythms* **26**, 24–33.

- Ferrini, F., Salio, C., Lossi, L. y Merighi, A. (2009). Ghrelin in Central Neurons. *Curr. Neuropharmacol.* **7**, 37–49.
- Folgueira, M., Sueiro, C., Rodríguez-Moldes, I., Yáñez, J. y Anadón, R. (2007). Organization of the *torus longitudinalis* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an immunohistochemical study of the GABAergic system and a Dil tract-tracing study. *J. Comp. Neurol.* **503**, 348–370.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L. y Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**, 1531–1545.
- Franklin, C. E., Davison, W. y Forster, M. E. (1992). Seawater adaptability of New Zealand's sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and chinook salmon (*O. tshawytscha*): physiological correlates of smoltification and seawater survival. *Aquaculture* **102**, 127–142.
- Froy, O. (2007). The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front. Neuroendocrinol.* **28**, 61–71.
- Fujimiya, M., Ataka, K., Asakawa, A., Chen, C.-Y., Kato, I. y Inui, A. (2012). Regulation of gastroduodenal motility: acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin and hypothalamic peptides. *Digestion* **85**, 90–94.
- Fukuoka, Y., Burioka, N., Takata, M., Ohdo, S., Miyata, M., Endo, M. y Shimizu, E. (2005). Glucocorticoid administration increases *hPer1* mRNA levels in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* or *in vivo*. *J. Biol. Rhythms* **20**, 550–553.
- Funahashi, H., Takenoya, F., Guan, J.-L., Kageyama, H., Yada, T. y Shioda, S. (2003). Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. *Anat. Sci. Int.* **78**, 123–138.
- Furuse, M., Tachibana, T., Ohgushi, A., Ando, R., Yoshimatsu, T. y Denbow, D. M. (2001). Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks. *Neurosci. Lett.* **301**, 123–126.
- Gahete, M. D., Rincón-Fernández, D., Villa-Osaba, A., Hormaechea-Agulla, D., Ibáñez-Costa, A., Martínez-Fuentes, A. J., Gracia-Navarro, F., Castaño, J. P. y Luque, R. M. (2014). Ghrelin gene products, receptors, and GOAT enzyme: biological and pathophysiological insight. *J. Endocrinol.* **220**, R1–24.
- Galas, L., Chartrel, N., Kojima, M., Kangawa, K. y Vaudry, H. (2002). Immunohistochemical localization and biochemical characterization of ghrelin in the brain and stomach of the frog *Rana esculenta*. *J. Comp. Neurol.* **450**, 34–44.
- Galon, J., Franchimont, D., Hiroi, N., Frey, G., Boettner, A., Ehrhart-Bornstein, M., O'Shea, J. J., Chrousos, G. P. y Bornstein, S. R. (2002). Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J.* **16**, 61–71.
- Galton, V. A. (1990). Mechanisms underlying the acceleration of thyroid hormone-induced tadpole metamorphosis by corticosterone. *Endocrinology* **127**, 2997–3002.
- Garcia, L. E. y Meier, A. H. (1973). Daily rhythms in concentration of plasma cortisol in male and female gulf killifish, *Fundulus grandis*. *Biol. Bull.* **144**, 471–479.
- García-Fernández, J. M., Álvarez-López, C. y Cernuda-Cernuda, R. (2007). Cytoplasmic localization of *mPER1* clock protein isoforms in the mouse retina. *Neurosci. Lett.* **419**, 55–58.



- Gauna, C., Delhanty, P. J. D., Hofland, L. J., Janssen, J. A. M. J. L., Broglio, F., Ross, R. J. M., Ghigo, E. y van der Lely, A. J. (2005). Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 1055–1060.
- Geelissen, S. M. E., Beck, I. M. E., Darras, V. M., Kühn, E. R. y Van der Geyten, S. (2003). Distribution and regulation of chicken growth hormone secretagogue receptor isoforms. *Gen. Comp. Endocrinol.* **134**, 167–174.
- Gerhold, L. M., Rosewell, K. L. y Wise, P. M. (2005). Suppression of vasoactive intestinal polypeptide in the suprachiasmatic nucleus leads to aging-like alterations in cAMP rhythms and activation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *J. Neurosci.* **25**, 62–67.
- Gerstner, J. R., Vander Heyden, W. M., Lavaute, T. M. y Landry, C. F. (2006). Profiles of novel diurnally regulated genes in mouse hypothalamus: expression analysis of the cysteine and histidine-rich domain-containing, zinc-binding protein 1, the fatty acid-binding protein 7 and the GTPase, ras-like family member 11b. *Neuroscience* **139**, 1435–1448.
- Ghelardoni, S., Carnicelli, V., Frascarelli, S., Ronca-Testoni, S. y Zucchi, R. (2006). Ghrelin tissue distribution: comparison between gene and protein expression. *J. Endocrinol. Invest.* **29**, 115–121.
- Gibbs, M. A. y Northmore, D. P. (1998). Spectral sensitivity of the goldfish *Torus longitudinalis*. *Vis. Neurosci.* **15**, 859–865.
- Gil-Campos, M., Aguilera, C. M., Cañete, R. y Gil, A. (2006). Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *Br. J. Nutr.* **96**, 201–226.
- Girotti, M., Weinberg, M. S. y Spencer, R. L. (2009). Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: system-wide shifts in response to a restricted feeding schedule. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**, E888–897.
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S. A., Morris, D. G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A. B. y Korbonits, M. (2002). The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 2988.
- Goel, A. y Buonomano, D. V. (2014). Timing as an intrinsic property of neural networks: evidence from *in vivo* and *in vitro* experiments. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **369**, 20120460.
- Gonze, D. y Goldbeter, A. (2000). Entrainment versus chaos in a model for a circadian oscillator driven by light-dark cycles. *J. Stat. Phys.* **101**, 649–663.
- Goto, M., Arima, H., Watanabe, M., Hayashi, M., Banno, R., Sato, I., Nagasaki, H. y Oiso, Y. (2006). Ghrelin increases neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression in the arcuate nucleus in rat hypothalamic organotypic cultures. *Endocrinology* **147**, 5102–5109.
- Greenwood, A. K., Butler, P. C., White, R. B., DeMarco, U., Pearce, D. y Fernald, R. D. (2003). Multiple corticosteroid receptors in a teleost fish: distinct sequences, expression patterns, and transcriptional activities. *Endocrinology* **144**, 4226–4236.
- Gualillo, O., Caminos, J., Blanco, M., García-Caballero, T., Kojima, M., Kangawa, K., Dieguez, C. y Casanueva, F. (2001). Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* **142**, 788–794.
- Guan, X. M., Yu, H., Palyha, O. C., McKee, K. K., Feighner, S. D., Sirinathsinghji, D. J., Smith, R. G., Van der Ploeg, L. H. y Howard, A. D. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **48**, 23–29.

- Guan, J.-L., Wang, Q.-P., Kageyama, H., Takenoya, F., Kita, T., Matsuoka, T., Funahashi, H. y Shioda, S. (2003). Synaptic interactions between ghrelin- and neuropeptide Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Peptides* **24**, 1921–1928.
- Guan, J.-L., Okuda, H., Takenoya, F., Kintaka, Y., Yagi, M., Wang, L., Seki, M., Hori, Y., Kageyama, H. y Shioda, S. (2008). Synaptic relationships between proopiomelanocortin- and ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Regul. Pept.* **145**, 128–132.
- Guan, H.-Z., Li, Q.-C. y Jiang, Z.-Y. (2010). Ghrelin acts on rat dorsal vagal complex to stimulate feeding via arcuate neuropeptide Y/agouti-related peptide neurons activation. *Sheng Li Xue Bao* **62**, 357–364.
- Guido, M. E., Garbarino-Pico, E., Contin, M. A., Valdez, D. J., Nieto, P. S., Verra, D. M., Acosta-Rodriguez, V. A., de Zavalía, N. y Rosenstein, R. E. (2010). Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system. *Prog. Neurobiol.* **92**, 484–504.
- Guilding, C., Hughes, A. T. L. y Piggins, H. D. (2010). Circadian oscillators in the epithalamus. *Neuroscience* **169**, 1630–1639.
- Gutierrez, J. A., Solenberg, P. J., Perkins, D. R., Willency, J. A., Knierman, M. D., Jin, Z., Witcher, D. R., Luo, S., Onyia, J. E. y Hale, J. E. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6320–6325.
- Hadley, M. E. (1997). Hormonas esteroides adrenales. In *Endocrinología*, pp. 395–432. Madrid: Prentice Hall.
- Hara, R., Wan, K., Wakamatsu, H., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M. y Shibata, S. (2001). Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **6**, 269–278.
- Hardeland, R. (2008). Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2001–2018.
- Hardin, P. E. (2004). Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. *J. Biol. Rhythms* **19**, 348–360.
- Hashinaga, T., Wada, N., Otabe, S., Yuan, X., Kurita, Y., Kakino, S., Tanaka, K., Sato, T., Kojima, M., Ohki, T., et al. (2013). Modulation by adiponectin of circadian clock rhythmicity in model mice for metabolic syndrome. *Endocr. J.* **60**, 483–492.
- Hastings, M., O'Neill, J. S. y Maywood, E. S. (2007). Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J. Endocrinol.* **195**, 187–198.
- Hastings, M. H., Maywood, E. S. y Reddy, A. B. (2008). Two decades of circadian time. *J. Neuroendocrinol.* **20**, 812–819.
- Hattori, N., Saito, T., Yagyu, T., Jiang, B. H., Kitagawa, K. y Inagaki, C. (2001). GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 4284–4291.
- Haus, E. (2007). Chronobiology in the endocrine system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 985–1014.
- Henley, D. E. y Lightman, S. L. (2011). New insights into corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid delivery. *Neuroscience* **180**, 1–8.
- Hirai, T., Tanaka, K. y Togari, A. (2015).  $\alpha$ 1B-Adrenergic receptor signaling controls circadian expression of Tnfrsf11b by regulating clock genes in osteoblasts. *Biol. Open.*

- Holliday, N. D., Holst, B., Rodionova, E. A., Schwartz, T. W. y Cox, H. M. (2007). Importance of constitutive activity and arrestin-independent mechanisms for intracellular trafficking of the ghrelin receptor. *Mol. Endocrinol.* **21**, 3100–3112.
- Holmes, E., Davies, I., Lowe, G. y Ranganath, L. R. (2009). Circulating ghrelin exists in both lipoprotein bound and free forms. *Ann. Clin. Biochem.* **46**, 514–516.
- Holmqvist, B. I., Ostholm, T. y Ekström, P. (1992). Dil tracing in combination with immunocytochemistry for analysis of connectivities and chemoarchitectonics of specific neural systems in a teleost, the atlantic salmon. *J. Neurosci. Methods* **42**, 45–63.
- Holst, B., Cygankiewicz, A., Jensen, T. H., Ankersen, M. y Schwartz, T. W. (2003). High constitutive signaling of the ghrelin receptor—identification of a potent inverse agonist. *Mol. Endocrinol.* **17**, 2201–2210.
- Holst, B. y Schwartz, T. W. (2004). Constitutive ghrelin receptor activity as a signaling set-point in appetite regulation. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 113–117.
- Holst, B., Holliday, N. D., Bach, A., Elling, C. E., Cox, H. M. y Schwartz, T. W. (2004). Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J. Biol. Chem.* **279**, 53806–53817.
- Hontela, A. y Peter, R. E. (1983). Characteristics and functional significance of daily cycles in serum gonadotropin hormone levels in the goldfish. *J. Exp. Zool.* **228**, 543–550.
- Hoogerwerf, W. A., Hellmich, H. L., Cornélissen, G., Halberg, F., Shahinian, V. B., Bostwick, J., Savidge, T. C. y Cassone, V. M. (2007). Clock gene expression in the murine gastrointestinal tract: endogenous rhythmicity and effects of a feeding regimen. *Gastroenterology* **133**, 1250–1260.
- Hori, Y., Kageyama, H., Guan, J.-L., Kohno, D., Yada, T., Takenoya, F., Nonaka, N., Kangawa, K., Shioda, S. y Yoshida, T. (2008). Synaptic interaction between ghrelin- and ghrelin-containing neurons in the rat hypothalamus. *Regul. Pept.* **145**, 122–127.
- Hoskins, L. J. y Volkoff, H. (2012). Daily patterns of mRNA expression of two core circadian regulatory proteins, *Clock2* and *Per1*, and two appetite-regulating peptides, OX and NPY, in goldfish (*Carassius auratus*). *Comp. Biochem. Physiol. A.* **163**, 127–136.
- Hosoda, H., Kojima, M. y Kangawa, K. (2006). Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *J. Pharmacol. Sci.* **100**, 398–410.
- Hosoda, H. y Kangawa, K. (2008). The autonomic nervous system regulates gastric ghrelin secretion in rats. *Regul. Pept.* **146**, 12–18.
- Hou, Z., Miao, Y., Gao, L., Pan, H. y Zhu, S. (2006). Ghrelin-containing neuron in cerebral cortex and hypothalamus linked with the DVC of brainstem in rat. *Regul. Pept.* **134**, 126–131.
- Howard, A. D., Feighner, S. D., Cully, D. F., Arena, J. P., Liberato, P. A., Rosenblum, C. I., Hamelin, M., Hreniuk, D. L., Palyha, O. C., Anderson, J., et al. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* **273**, 974–977.
- Huang, N., Chelliah, Y., Shan, Y., Taylor, C. A., Yoo, S.-H., Partch, C., Green, C. B., Zhang, H. y Takahashi, J. S. (2012). Crystal Structure of the Heterodimeric CLOCK:BMAL1 Transcriptional Activator Complex. *Science* **337**, 189–194.
- Huesa, G., van den Pol, A. N. y Finger, T. E. (2005). Differential distribution of hypocretin (orexin) and melanin-concentrating hormone in the goldfish brain. *J. Comp. Neurol.* **488**, 476–491.

- Hügin-Flores, M. E., Steimer, T., Aubert, M. L. y Schulz, P. (2004). Mineralo- and glucocorticoid receptor mRNAs are differently regulated by corticosterone in the rat hippocampus and anterior pituitary. *Neuroendocrinology* **79**, 174–184.
- Hur, S.-P., Takeuchi, Y., Itoh, H., Uchimura, M., Takahashi, K., Kang, H.-C., Lee, Y.-D., Kim, S.-J. y Takemura, A. (2012). Fish sleeping under sandy bottom: interplay of melatonin and clock genes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **177**, 37–45.
- Hurd, M. W., Debruyne, J., Straume, M. y Cahill, G. M. (1998). Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. *Physiol. Behav.* **65**, 465–472.
- Husse, J., Hintze, S. C., Eichele, G., Lehnert, H. y Oster, H. (2012). Circadian Clock Genes *Per1* and *Per2* Regulate the Response of Metabolism-Associated Transcripts to Sleep Disruption. *PLoS ONE* **7**,.
- Ida, T., Miyazato, M., Naganobu, K., Nakahara, K., Sato, M., Lin, X.-Z., Kaiya, H., Doi, K., Noda, S., Kubo, A., et al. (2007). Purification and characterization of feline ghrelin and its possible role. *Domest. Anim. Endocrinol.* **32**, 93–105.
- Ida, T. (2012). Variety of acyl modifications in mammalian ghrelins. *Methods Enzymol.* **514**, 63–73.
- Idler, D. R. y Truscott, B. (1972). Corticosteroids in fish. In *Steroids in nonmammalian vertebrates.*, pp. 127–211. New York: Academic Press.
- Iger, Y., Balm, P. H., Jenner, H. A. y Wendelaar Bonga, S. E. (1995). Cortisol induces stress-related changes in the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **97**, 188–198.
- Iigo, M. y Tabata, M. (1996). Circadian rhythms of locomotor activity in the goldfish *Carassius auratus*. *Physiol. Behav.* **60**, 775–781.
- Ikegami, T., Azuma, K., Nakamura, M., Suzuki, N., Hattori, A. y Ando, H. (2009). Diurnal expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the optic tectum and retina of goldfish. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **152**, 219–224.
- Isorna, E., Alonso-Gómez, A. L., De Pedro, N., Nisembaum, L. G., Sánchez-Bretaño, A. y Delgado, M. J. (2015). Entrainment of circadian oscillators in fish: integratin external and endogenous signals. In *Advances in Comparative Endocrinology Vol. VII* (Ed. Navarro I, Gutiérrez J, Capilla E.) pp. 26–32. Barcelona: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Iuvone, P. M., Tosini, G., Pozdeyev, N., Haque, R., Klein, D. C. y Chaurasia, S. S. (2005). Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **24**, 433–456.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Brunet, F., Petit, J.-L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., et al. (2004). Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* **431**, 946–957.
- Johnston, J. D. (2014). Physiological links between circadian rhythms, metabolism and nutrition. *Exp. Physiol.* **99**, 1133–1137.
- Jönsson, E. (2013). The role of ghrelin in energy balance regulation in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **187**, 79–85.
- Jönsson, E., Forsman, A., Einarsdottir, I. E., Kaiya, H., Ruohonen, K. y Björnsson, B. T. (2007). Plasma ghrelin levels in rainbow trout in response to fasting, feeding and food composition, and effects of ghrelin on voluntary food intake. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **147**, 1116–1124.

- Kaeffer, B. y Pardini, L. (2005). Clock genes of Mammalian cells: practical implications in tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **41**, 311–320.
- Kageyama, H., Takenoya, F., Shiba, K. y Shioda, S. (2010). Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *Neuropeptides* **44**, 133–138.
- Kageyama, H., Takenoya, F., Hirako, S., Wada, N., Kintaka, Y., Inoue, S., Ota, E., Ogawa, T. y Shioda, S. (2012). Neuronal circuits involving neuropeptide Y in hypothalamic arcuate nucleus-mediated feeding regulation. *Neuropeptides* **46**, 285–289.
- Kah, O., Pontet, A., Danger, J. M., Dubourg, P., Pelletier, G., Vaudry, H. y Calas, A. (1989). Characterization, cerebral distribution and gonadotropin release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiol. Biochem.* **7**, 69–76.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Koda, A., Yamamoto, K., Kitajima, Y., Matsumoto, M., Minamitake, Y., Kikuyama, S. y Kangawa, K. (2001). Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *J. Biol. Chem.* **276**, 40441–40448.
- Kaiya, H., Van Der Geyten, S., Kojima, M., Hosoda, H., Kitajima, Y., Matsumoto, M., Geelissen, S., Darras, V. M. y Kangawa, K. (2002). Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity. *Endocrinology* **143**, 3454–3463.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L. G., Hirano, T., Grau, E. G. y Kangawa, K. (2003a). Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J. Endocrinol.* **176**, 415–423.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L. G., Hirano, T., Grau, E. G. y Kangawa, K. (2003b). Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **135**, 421–429.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Moriyama, S., Takahashi, A., Kawauchi, H. y Kangawa, K. (2003c). Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology* **144**, 5215–5226.
- Kaiya, H., Sakata, I., Kojima, M., Hosoda, H., Sakai, T. y Kangawa, K. (2004). Structural determination and histochemical localization of ghrelin in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **138**, 50–57.
- Kaiya, H., Small, B. C., Bilodeau, A. L., Shepherd, B. S., Kojima, M., Hosoda, H. y Kangawa, K. (2005). Purification, cDNA cloning, and characterization of ghrelin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **143**, 201–210.
- Kaiya, H., Sakata, I., Yamamoto, K., Koda, A., Sakai, T., Kangawa, K. y Kikuyama, S. (2006). Identification of immunoreactive plasma and stomach ghrelin, and expression of stomach ghrelin mRNA in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **148**, 236–244.
- Kaiya, H., Miyazato, M., Kangawa, K., Peter, R. E. y Unniappan, S. (2008). Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **149**, 109–128.
- Kaiya, H., Riley, L. G., Janzen, W., Hirano, T., Grau, E. G., Miyazato, M. y Kangawa, K. (2009a). Identification and genomic sequence of a ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor in the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoolog. Sci.* **26**, 330–337.
- Kaiya, H., Mori, T., Miyazato, M. y Kangawa, K. (2009b). Ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor and its genomic organisation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **153**, 438–450.

- Kaiya, H., Miura, T., Matsuda, K., Miyazato, M. y Kangawa, K. (2010). Two functional growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) type 1a and 2a in goldfish, *Carassius auratus*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **327**, 25–39.
- Kaiya, H., Kangawa, K. y Miyazato, M. (2013a). Ghrelin Receptors in Non-Mammalian Vertebrates. *Front. Endocrinol.* **4**,.
- Kaiya, H., Kangawa, K. y Miyazato, M. (2013b). Update on ghrelin biology in birds. *Gen. Comp. Endocrinol.* **190**, 170–175.
- Kaji, H., Kishimoto, M., Kirimura, T., Iguchi, G., Murata, M., Yoshioka, S., Iida, K., Okimura, Y., Yoshimoto, Y. y Chihara, K. (2001). Hormonal regulation of the human ghrelin receptor gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 660–666.
- Kalsbeek, A., Buijs, R. M., van Heerikhuize, J. J., Arts, M. y van der Woude, T. P. (1992). Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release. *Brain Res.* **580**, 62–67.
- Kalsbeek, A., Teclemariam-Mesbah, R. y Pévet, P. (1993). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Comp. Neurol.* **332**, 293–314.
- Kalsbeek, A., Yi, C.-X., Cailotto, C., la Fleur, S. E., Fliers, E. y Buijs, R. M. (2011). Mammalian clock output mechanisms. *Essays Biochem.* **49**, 137–151.
- Kalsbeek, A., van der Spek, R., Lei, J., Endert, E., Buijs, R. M. y Fliers, E. (2012). Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **349**, 20–29.
- Kalsbeek, A. y Fliers, E. (2013). Daily regulation of hormone profiles. *Handb. Exp. Pharmacol.* 185–226.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H. y Wakabayashi, I. (2000). Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* **141**, 4797–4800.
- Kamegai, J., Tamura, H., Ishii, S., Sugihara, H. y Wakabayashi, I. (2001). Thyroid hormones regulate pituitary growth hormone secretagogue receptor gene expression. *J. Neuroendocrinol.* **13**, 275–278.
- Kang, K. S., Yahashi, S., Matsuda, K., Kang, K. S., Yahashi, S. y Matsuda, K. (2011a). The effects of ghrelin on energy balance and psychomotor activity in a goldfish model: an overview, the effects of ghrelin on energy balance and psychomotor activity in a goldfish model: an overview. *Int. J. Pept.* **2011**, e171034.
- Kang, K. S., Yahashi, S. y Matsuda, K. (2011b). Central and peripheral effects of ghrelin on energy balance, food intake and lipid metabolism in teleost fish. *Peptides* **32**, 2242–2247.
- Kapica, M., Laubitz, D., Puzio, I., Jankowska, A. y Zabielski, R. (2006). The ghrelin pentapeptide inhibits the secretion of pancreatic juice in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* **57**, 691–700.
- Kaslin, J., Nystedt, J. M., Ostergård, M., Peitsaro, N. y Panula, P. (2004). The orexin/hypocretin system in zebrafish is connected to the aminergic and cholinergic systems. *J. Neurosci.* **24**, 2678–2689.
- Kerbel, B. y Unniappan, S. (2012). Nesfatin-1 suppresses energy intake, co-localises ghrelin in the brain and gut, and alters ghrelin, cholecystokinin and orexin mRNA expression in goldfish. *J. Neuroendocrinol.* **24**, 366–377.

- Kim, S. W., Her, S. J., Park, S. J., Kim, D., Park, K. S., Lee, H. K., Han, B. H., Kim, M. S., Shin, C. S. y Kim, S. Y. (2005). Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* **37**, 359–369.
- Kineman, R. D., Kamegai, J. y Frohman, L. A. (1999). Growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) and the GH secretagogue (GHS), L692,585, differentially modulate rat pituitary GHS receptor and GHRH receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* **140**, 3581–3586.
- Kirchner, H., Gutierrez, J. A., Solenberg, P. J., Pfluger, P. T., Czyzyk, T. A., Willency, J. A., Schürmann, A., Joost, H.-G., Jandacek, R. J., Hale, J. E., et al. (2009). GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat. Med.* **15**, 741–745.
- Kitazawa, T., Kaiya, H. y Taneike, T. (2007). Contractile effects of ghrelin-related peptides on the chicken gastrointestinal tract *in vitro*. *Peptides* **28**, 617–624.
- Kitazawa, T., Maeda, Y. y Kaiya, H. (2009). Molecular cloning of growth hormone secretagogue-receptor and effect of quail ghrelin on gastrointestinal motility in Japanese quail. *Regul. Pept.* **158**, 132–142.
- Kitazawa, T., Itoh, K., Yaosaka, N., Maruyama, K., Matsuda, K., Teraoka, H. y Kaiya, H. (2012). Ghrelin does not affect gastrointestinal contractility in rainbow trout and goldfish *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **178**, 539–545.
- Kitchener, P., Di Blasi, F., Borrelli, E. y Piazza, P. V. (2004). Differences between brain structures in nuclear translocation and DNA binding of the glucocorticoid receptor during stress and the circadian cycle. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 1837–1846.
- Kleinz, M. J., Maguire, J. J., Skepper, J. N. y Davenport, A. P. (2006). Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl ghrelin in the regulation of vascular tone in man. *Cardiovasc. Res.* **69**, 227–235.
- Kobayashi, Y., Ishikawa, T., Hirayama, J., Daiyasu, H., Kanai, S., Toh, H., Fukuda, I., Tsujimura, T., Terada, N., Kamei, Y., et al. (2000). Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells* **5**, 725–738.
- Kohno, D., Gao, H.-Z., Muroya, S., Kikuyama, S. y Yada, T. (2003). Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca<sup>2+</sup> signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* **52**, 948–956.
- Kohno, D., Nakata, M., Maekawa, F., Fujiwara, K., Maejima, Y., Kuramochi, M., Shimazaki, T., Okano, H., Onaka, T. y Yada, T. (2007). Leptin suppresses ghrelin-induced activation of neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus via phosphatidylinositol 3-kinase- and phosphodiesterase 3-mediated pathway. *Endocrinology* **148**, 2251–2263.
- Kohno, D. y Yada, T. (2012). Arcuate NPY neurons sense and integrate peripheral metabolic signals to control feeding. *Neuropeptides* **46**, 315–319.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. y Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656–660.
- Kojima, M. y Kangawa, K. (2005). Ghrelin: structure and function. *Physiol. Rev.* **85**, 495–522.
- Kola, B., Farkas, I., Christ-Crain, M., Wittmann, G., Lolli, F., Amin, F., Harvey-White, J., Liposits, Z., Kunos, G., Grossman, A. B., et al. (2008). The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One* **3**, e1797.

- Konopka, R. J. y Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 2112–2116.
- Korbonits, M., Kojima, M., Kangawa, K. y Grossman, A. B. (2001). Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* **14**, 101–104.
- Kornmann, B., Schaad, O., Reinke, H., Saini, C. y Schibler, U. (2007). Regulation of circadian gene expression in liver by systemic signals and hepatocyte oscillators. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **72**, 319–330.
- Kottelat, M. y Freyhof, J. (2007). *Handbook of European freshwater fishes*. Publicaciones Kottelat, Suiza.
- Koukkari, W. L. y Sothorn, R. B. (2006). *Introducing Biological Rhythms: A Primer on the Temporal Organization of Life, with Implications for Health, Society, Reproduction, and the Natural Environment*. Springer Science & Business Media.
- Krieger, D. T. (1982). Physiology of Regulation of ACTH Secretion. In *Cushing's Syndrome*, (Ed. Dorothy T. Krieger M. D.) pp. 5–22. Springer Berlin Heidelberg.
- Krout, K. E., Kawano, J., Mettenleiter, T. C. y Loewy, A. D. (2002). CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience* **110**, 73–92.
- Krug, E. C., Honn, K. V., Battista, J. y Nicoll, C. S. (1983). Corticosteroids in serum of *Rana catesbeiana* during development and metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **52**, 232–241.
- Kühn, E. R., Corneillie, S. y Ollevier, F. (1986). Circadian variations in plasma osmolality, electrolytes, glucose, and cortisol in carp (*Cyprinus carpio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**, 459–468.
- Kulkarni, S. S. y Buchholz, D. R. (2014). Corticosteroid signaling in frog metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **203**, 225–231.
- Kumar, P., Challet, E. y Kalsbeek, A. (2015). Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. *Mol. Cell. Endocrinol.* **418**, 74–88.
- Kuo, T., Harris, C. A. y Wang, J.-C. (2013). Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.* **380**, 79–88.
- Kuo, T., McQueen, A., Chen, T.-C. y Wang, J.-C. (2015). Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* **872**, 99–126.
- Labeur, M. y Holsboer, F. (2010). Mecanismos moleculares de señalización del receptor de glucocorticoides. *Medicina (Mex.)* **70**, 457–462.
- Lamont, E. W., Robinson, B., Stewart, J. y Amir, S. (2005). The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein *Period2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4180–4184.
- Lance, V. A. y Lauren, D. (1984). Circadian variation in plasma corticosterone in the American alligator, *Alligator mississippiensis*, and the effects of ACTH injections. *Gen. Comp. Endocrinol.* **54**, 1–7.
- Lanfranco, F., Motta, G., Baldi, M., Gasco, V., Grottoli, S., Benso, A., Broglio, F. y Ghigo, E. (2010). Ghrelin and anterior pituitary function. *Front. Horm. Res.* **38**, 206–211.
- Leatherland, J. F. y McKeown, B. A. (1973). Circadian rhythm in the plasma levels of prolactin in goldfish, *Carassius auratus* L. *J. Interdiscip. Cycle Res.* **4**, 137–143.



- Leise, T. L., Wang, C. W., Gitis, P. J. y Welsh, D. K.** (2012). Persistent cell-autonomous circadian oscillations in fibroblasts revealed by six-week single-cell imaging of PER2::LUC bioluminescence. *PLoS One* **7**, e33334.
- Leliavski, A., Dumbell, R., Ott, V. y Oster, H.** (2015). Adrenal clocks and the role of adrenal hormones in the regulation of circadian physiology. *J. Biol. Rhythms* **30**, 20–34.
- LeSauter, J., Hoque, N., Weintraub, M., Pfaff, D. W. y Silver, R.** (2009). Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13582–13587.
- Leung, P.-K., Chow, K. B. S., Lau, P.-N., Chu, K.-M., Chan, C.-B., Cheng, C. H. K. y Wise, H.** (2007). The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cell. Signal.* **19**, 1011–1022.
- Li, J., Hu, Z. y Lecea, L.** (2014a). The hypocretins/orexins: integrators of multiple physiological functions. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 332–350.
- Li, Z., Xu, G., Qin, Y., Zhang, C., Tang, H., Yin, Y., Xiang, X., Li, Y., Zhao, J., Mulholland, M., et al.** (2014b). Ghrelin promotes hepatic lipogenesis by activation of mTOR-PPAR $\gamma$  signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 13163–13168.
- Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J. F., Clark, B. J., Stocco, D. M., Saenger, P., Rogol, A. y Miller, W. L.** (1995). Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* **267**, 1828–1831.
- Lin, H.-Y., Muller, Y. A. y Hammond, G. L.** (2010). Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. *Mol. Cell. Endocrinol.* **316**, 3–12.
- Lin, X.-W., Blum, I. D. y Storch, K.-F.** (2015). Clocks within the master gland: hypophyseal rhythms and their physiological significance. *J. Biol. Rhythms* **30**, 263–276.
- Lincoln, G. A., Andersson, H. y Hazlerigg, D.** (2003). Clock genes and the long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/circannual timer in the pars tuberalis. *J. Neuroendocrinol.* **15**, 390–397.
- Loh, D. H., Dragich, J. M., Kudo, T., Schroeder, A. M., Nakamura, T. J., Waschek, J. A., Block, G. D. y Colwell, C. S.** (2011). Effects of vasoactive intestinal peptide genotype on circadian gene expression in the suprachiasmatic nucleus and peripheral organs. *J. Biol. Rhythms* **26**, 200–209.
- Lombès, M., Oblin, M. E., Gasc, J. M., Baulieu, E. E., Farman, N. y Bonvalet, J. P.** (1992). Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ. Res.* **71**, 503–510.
- López-Olmeda, J. F., Blanco-Vives, B., Pujante, I. M., Wunderink, Y. S., Mancera, J. M. y Sánchez-Vázquez, F. J.** (2013). Daily rhythms in the hypothalamus-pituitary-interrenal axis and acute stress responses in a teleost flatfish, *Solea senegalensis*. *Chronobiol. Int.* **30**, 530–539.
- López-Patiño, M. A., Alonso-Gómez, A. L., Guijarro, A., Isorna, E. y Delgado, M. J.** (2008). Melatonin receptors in brain areas and ocular tissues of the teleost *Tinca tinca*: characterization and effect of temperature. *Gen. Comp. Endocrinol.* **155**, 847–856.
- López-Patiño, M. A. L., Rodríguez-Illamola, A., Conde-Sieira, M., Soengas, J. L. y Míguez, J. M.** (2011). Daily rhythmic expression patterns of *clock1a*, *bmal1*, and *per1* genes in retina and hypothalamus of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Chronobiol. Int.* **28**, 381–389.

- Lu, S., Guan, J.-L., Wang, Q.-P., Uehara, K., Yamada, S., Goto, N., Date, Y., Nakazato, M., Kojima, M., Kangawa, K., et al. (2002). Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci. Lett.* **321**, 157–160.
- Luiten, P. G. M., ter Horst, G. J. y Steffens, A. B. (1987). The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Prog. Neurobiol.* **28**, 1–54.
- Lynch, M. y Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* **290**, 1151–1155.
- Macfarlane, D. P., Forbes, S. y Walker, B. R. (2008). Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J. Endocrinol.* **197**, 189–204.
- Madrid, J. A., Boujard, T. y Sánchez-Vázquez, F. J. (2001). Feeding rhythms. In *Food intake in fish* (ed. Houlihan, D., Boujard, T., and Jobling, I.), pp. 189–215. Blackwell Science Ltd.
- Madrid, J. A. (2006). Los relojes de la vida. Una introducción a la cronobiología. In *Cronobiología básica y clínica* (Ed. Madrid, J. A. y Ro de Lama, M. A.) pp. 39–82. Madrid, Editec@Red.
- Maejima, Y., Kohno, D., Iwasaki, Y. y Yada, T. (2011). Insulin suppresses ghrelin-induced calcium signaling in neuropeptide Y neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. *Aging* **3**, 1092–1097.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* **83**, 835–839.
- Martín-Robles, A. J., Isorna, E., Whitmore, D., Muñoz-Cueto, J. A. y Pendón, C. (2011). The clock gene *Period3* in the nocturnal flatfish *Solea senegalensis*: Molecular cloning, tissue expression and daily rhythms in central areas. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **159**, 7–15.
- Martín-Robles, Á. J., Whitmore, D., Sánchez-Vázquez, F. J., Pendón, C. y Muñoz-Cueto, J. A. (2012). Cloning, tissue expression pattern and daily rhythms of *Period1*, *Period2*, and *Clock* transcripts in the flatfish Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *J. Comp. Physiol. B.* **182**, 673–685.
- Matsuda, K., Miura, T., Kaiya, H., Maruyama, K., Shimakura, S., Uchiyama, M., Kangawa, K. y Shioda, S. (2006). Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish. *Peptides* **27**, 2321–2325.
- Maule, A. G. y Schreck, C. B. (1990). Changes in numbers of leukocytes in immune organs of juvenile coho salmon after acute stress or cortisol treatment. *J. Aquat. Anim. Health* **2**, 298–304.
- Mazurais, D., Brierley, I., Anglade, I., Drew, J., Randall, C., Bromage, N., Michel, D., Kah, O. y Williams, L. M. (1999). Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. *J. Comp. Neurol.* **409**, 313–324.
- Mazurais, D., Le Dréan, G., Brierley, I., Anglade, I., Bromage, N., Williams, L. M. y Kah, O. (2000). Expression of clock gene in the brain of rainbow trout: comparison with the distribution of melatonin receptors. *J. Comp. Neurol.* **422**, 612–620.
- Mazzocchi, G., Neri, G., Rucinski, M., Rebuffat, P., Spinazzi, R., Malendowicz, L. K. y Nussdorfer, G. G. (2004). Ghrelin enhances the growth of cultured human adrenal zona glomerulosa cells by exerting MAPK-mediated proliferogenic and antiapoptotic effects. *Peptides* **25**, 1269–1277.
- Mazzocchi, G., Paziienza, V. y Vinciguerra, M. (2012). Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. *Chronobiol. Int.* **29**, 227–251.

- McEwen, B. S., Biron, C. A., Brunson, K. W., Bulloch, K., Chambers, W. H., Dhabhar, F. S., Goldfarb, R. H., Kitson, R. P., Miller, A. H., Spencer, R. L., et al.** (1997). The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **23**, 79–133.
- McEwen, B. S.** (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol. Rev.* **87**, 873–904.
- McKeown, B. A. y Peter, R. E.** (1976). The effects of photoperiod and temperature on the release of prolactin from the pituitary gland of the goldfish, *Carassius auratus* L. *Can. J. Zool.* **54**, 1960–1968.
- McNeilly, A. D., Macfarlane, D. P., O’Flaherty, E., Livingstone, D. E., Mitić, T., McConnell, K. M., McKenzie, S. M., Davies, E., Reynolds, R. M., Thiesson, H. C., et al.** (2010). Bile acids modulate glucocorticoid metabolism and the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in obstructive jaundice. *J. Hepatol.* **52**, 705–711.
- Mehi, A. Z., DiBattista, J. A. y Sandor, T.** (1987). Characterization of steroid receptors in the gut and kidney of the frog (*Rana catesbeiana*) and in the gut of the turtle (*Chrysemys picta*). *J. Steroid Biochem.* **26**, 627–639.
- Menaker, M., Moreira, L. F. y Tosini, G.** (1997). Evolution of circadian organization in vertebrates. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**, 305–313.
- Mendoza, J.** (2007). Circadian clocks: setting time by food. *J. Neuroendocrinol.* **19**, 127–137.
- Mendoza, J., Pévet, P., Felder-Schmittbuhl, M.-P., Bailly, Y. y Challet, E.** (2010). The cerebellum harbors a circadian oscillator involved in food anticipation. *J. Neurosci.* **30**, 1894–1904.
- Mendoza, J., Lopez-Lopez, C., Revel, F. G., Jeanneau, K., Delerue, F., Prinssen, E., Challet, E., Moreau, J.-L. y Grundschober, C.** (2011). Dimorphic effects of leptin on the circadian and hypocretinergic systems of mice. *J. Neuroendocrinol.* **23**, 28–38.
- Mistlberger, R. E.** (2011). Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol. Behav.* **104**, 535–545.
- Miura, T., Maruyama, K., Shimakura, S.-I., Kaiya, H., Uchiyama, M., Kangawa, K., Shioda, S. y Matsuda, K.** (2006). Neuropeptide Y mediates ghrelin-induced feeding in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci. Lett.* **407**, 279–283.
- Miura, T., Maruyama, K., Shimakura, S.-I., Kaiya, H., Uchiyama, M., Kangawa, K., Shioda, S. y Matsuda, K.** (2007). Regulation of food intake in the goldfish by interaction between ghrelin and orexin. *Peptides* **28**, 1207–1213.
- Miura, T., Maruyama, K., Kaiya, H., Miyazato, M., Kangawa, K., Uchiyama, M., Shioda, S. y Matsuda, K.** (2009). Purification and properties of ghrelin from the intestine of the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides* **30**, 758–765.
- Moguilewsky, M. y Raynaud, J. P.** (1980). Evidence for a specific mineralocorticoid receptor in rat pituitary and brain. *J. Steroid Biochem.* **12**, 309–314.
- Mohawk, J. A., Green, C. B. y Takahashi, J. S.** (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* **35**, 445–462.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M. y Moon, T. W.** (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* **9**, 211–268.

- Mondal, M. S., Date, Y., Yamaguchi, H., Toshinai, K., Tsuruta, T., Kangawa, K. y Nakazato, M.** (2005). Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. *Regul. Pept.* **126**, 55–59.
- Moore, R. Y. y Eichler, V. B.** (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* **42**, 201–206.
- Moore, I. T. y Jessop, T. S.** (2003). Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Horm. Behav.* **43**, 39–47.
- Moore, R. Y.** (2013). The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **119**, 1–28.
- Moore, H. A. y Whitmore, D.** (2014). Circadian rhythmicity and light sensitivity of the zebrafish brain. *PLoS ONE* **9**, e86176.
- Mori, K., Yoshimoto, A., Takaya, K., Hosoda, K., Ariyasu, H., Yahata, K., Mukoyama, M., Sugawara, A., Hosoda, H., Kojima, M., et al.** (2000). Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett.* **486**, 213–216.
- Morse D. y Sassone-Corsi, P.** (2002). Time after time: inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. *Trends Neurosci.* **25**, 632–637.
- Morton, G. J. y Schwartz, M. W.** (2001). The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **25**, S56–62.
- Motzkus, D., Maronde, E., Grunenberg, U., Lee, C. C., Forssmann, W. y Albrecht, U.** (2000). The human *PER1* gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathways. *FEBS Lett.* **486**, 315–319.
- Mühlbauer, E., Wolgast, S., Finckh, U., Peschke, D. y Peschke, E.** (2004). Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett.* **564**, 91–96.
- Munck, A., Guyre, P. M. y Holbrook, N. J.** (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* **5**, 25–44.
- Muus, B. J. y Dahlström, P.** (1981) *Los peces de agua dulce de España y Europa*. Omega, Barcelona.
- Muñoz, E. y Baler, R.** (2003). The circadian E-box: when perfect is not good enough. *Chronobiol. Int.* **20**, 371–388.
- Muñoz-Cueto, J. A., Sarasquete, C. y Kah, O.** (1998). The *torus longitudinalis* in the gilthead seabream: an undescribed fiber tract link with the valvula cerebelli. *Histol. Histopathol.* **13**, 391–394.
- Murashita, K., Kurokawa, T., Nilsen, T. O. y Rønnestad, I.** (2009). Ghrelin, cholecystokinin, and peptide YY in Atlantic salmon (*Salmo salar*): molecular cloning and tissue expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* **160**, 223–235.
- Mustonen, A. M., Nieminen, P. y Hyvärinen, H.** (2001). Preliminary evidence that pharmacologic melatonin treatment decreases rat ghrelin levels. *Endocrine* **16**, 43–46.
- Mustonen, A.-M., Nieminen, P. y Hyvärinen, H.** (2002). Leptin, ghrelin, and energy metabolism of the spawning burbot (*Lota lota* L.). *J. Exp. Zool.* **293**, 119–126.
- Nader, N., Chrousos, G. P. y Kino, T.** (2010). Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 277–286.
- Nagaya, N., Miyatake, K., Uematsu, M., Oya, H., Shimizu, W., Hosoda, H., Kojima, M., Nakanishi, N., Mori, H. y Kangawa, K.** (2001). Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 5854–5859.

- Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F. y Schibler, U.** (2004). Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* **119**, 693–705.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K. y Matsukura, S.** (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **409**, 194–198.
- Naleid, A. M., Grace, M. K., Cummings, D. E. y Levine, A. S.** (2005). Ghrelin induces feeding in the mesolimbic reward pathway between the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Peptides* **26**, 2274–2279.
- Namihira, M., Honma, S., Abe, H., Tanahashi, Y., Ikeda, M. y Honma, K.** (1999). Daily variation and light responsiveness of mammalian clock gene, *Clock* and *BMAL1*, transcripts in the pineal body and different areas of brain in rats. *Neurosci. Lett.* **267**, 69–72.
- Neglia, S., Arcamone, N., Esposito, V., Gargiulo, G. y de Girolamo, P.** (2005). Presence and distribution of ghrelin-immunopositive cells in the chicken gastrointestinal tract. *Acta Histochem.* **107**, 3–9.
- Nicolaides, N. C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G. P. y Charmandari, E.** (2010). The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* **75**, 1–12.
- Nicolaides, N. C., Charmandari, E., Chrousos, G. P. y Kino, T.** (2014). Circadian endocrine rhythms: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its actions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1318**, 71–80.
- Nie, Q., Fang, M., Xie, L., Peng, X., Xu, H., Luo, C., Zhang, D. y Zhang, X.** (2009). Molecular characterization of the ghrelin and ghrelin receptor genes and effects on fat deposition in chicken and duck. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, 567120.
- Nikaido, Y., Aluru, N., McGuire, A., Park, Y.-J., Vijayan, M. M. y Takemura, A.** (2010). Effect of cortisol on melatonin production by the pineal organ of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **155**, 84–90.
- Nisembaum, L. G., Velarde, E., Tinoco, A. B., Azpeleta, C., de Pedro, N., Alonso-Gómez, A. L., Delgado, M. J. e Isorna, E.** (2012). Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol. Int.* **29**, 665–673.
- Nisembaum, L. G., de Pedro, N., Delgado, M. J., Sánchez-Bretaña, A. e Isorna, E.** (2014a). Orexin as an input of circadian system in goldfish: Effects on clock gene expression and locomotor activity rhythms. *Peptides* **52**, 29–37.
- Nisembaum, L. G., de Pedro, N., Delgado, M. J. e Isorna, E.** (2014b). Crosstalk between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* **205**, 287–295.
- Nishi, Y., Yoh, J., Hiejima, H. y Kojima, M.** (2011). Structures and molecular forms of the ghrelin-family peptides. *Peptides* **32**, 2175–2182.
- Nolasco, N., Juárez, C., Morgado, E., Meza, E. y Caba, M.** (2012). A circadian clock in the olfactory bulb anticipates feeding during food anticipatory activity. *PLoS ONE* **7**, e47779.
- Northmore, D. P. M.** (1984). Visual and saccadic activity in the goldfish *torus longitudinalis*. *J. Comp. Physiol. A* **155**, 333–340.
- Oishi, K., Fukui, H. e Ishida, N.** (2000). Rhythmic expression of *BMAL1* mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 164–171.

- Oishi, K., Amagai, N., Shirai, H., Kadota, K., Ohkura, N. y Ishida, N. (2005). Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res.* **12**, 191–202.
- Oka, K., Kohno, S., Urushitani, H., Guillelte Jr., L. J., Ohta, Y., Iguchi, T. y Katsu, Y. (2013). Molecular cloning and characterization of the corticoid receptors from the American alligator. *Mol. Cell. Endocrinol.* **365**, 153–161.
- Olsson, C., Holbrook, J. D., Bompadre, G., Jönsson, E., Hoyle, C. H. V., Sanger, G. J., Holmgren, S. y Andrews, P. L. R. (2008). Identification of genes for the ghrelin and motilin receptors and a novel related gene in fish, and stimulation of intestinal motility in zebrafish (*Danio rerio*) by ghrelin and motilin. *Gen. Comp. Endocrinol.* **155**, 217–226.
- Oosterman, J. E., Kalsbeek, A., la Fleur, S. E. y Belsham, D. D. (2015). Impact of nutrients on circadian rhythmicity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **308**, R337–350.
- Orchinik, M., Murray, T. F. y Moore, F. L. (1991). A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* **252**, 1848–1851.
- Oster, H., Damerow, S., Kiessling, S., Jakubcakova, V., Abraham, D., Tian, J., Hoffmann, M. W. y Eichele, G. (2006). The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab.* **4**, 163–173.
- Ota, T., Fustin, J.-M., Yamada, H., Doi, M. y Okamura, H. (2012). Circadian clock signals in the adrenal cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.* **349**, 30–37.
- Ottaway, C. A. y Husband, A. J. (1994). The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol. Today* **15**, 511–517.
- Overduin, J., Frayo, R. S., Grill, H. J., Kaplan, J. M. y Cummings, D. E. (2005). Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. *Endocrinology* **146**, 845–850.
- Pan, X. y Hussain, M. M. (2009). Clock is important for food and circadian regulation of macronutrient absorption in mice. *J. Lipid Res.* **50**, 1800–1813.
- Pancak, M. K. y Taylor, D. H. (1983). Seasonal and daily plasma corticosterone rhythms in American toads, *Bufo americanus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **50**, 490–497.
- Panda, S., Hogenesch, J. B. y Kay, S. A. (2002a). Circadian rhythms from flies to human. *Nature* **417**, 329–335.
- Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S. y Hogenesch, J. B. (2002b). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**, 307–320.
- Pardini, L. y Kaeffer, B. (2006). Feeding and circadian clocks. *Reprod. Nutr. Dev.* **46**, 18.
- Partch, C. L., Green, C. B. y Takahashi, J. S. (2014). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.* **24**, 90–99.
- Patton, D. F. y Mistlberger, R. E. (2013). Circadian adaptations to meal timing: neuroendocrine mechanisms. *Front. Neurosci.* **7**, 185.
- Paul, M. J., Indic, P. y Schwartz, W. J. (2011). A role for the habenula in the regulation of locomotor activity cycles. *Eur. J. Neurosci.* **34**, 478–488.

- Pavlidis, M., Greenwood, L., Paalavuo, M., Mölsä, H. y Laitinen, J. T.** (1999). The effect of photoperiod on diel rhythms in serum melatonin, cortisol, glucose, and electrolytes in the common dentex, *Dentex dentex*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **113**, 240–250.
- Payne, A. H. y Hales, D. B.** (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.* **25**, 947–970.
- Peirson, S. N., Butler, J. N., Duffield, G. E., Takher, S., Sharma, P. y Foster, R. G.** (2006). Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 800–807.
- Peng, C., Gallin, W., Peter, R. E., Blomqvist, A. G. y Larhammar, D.** (1994). Neuropeptide-Y gene expression in the goldfish brain: distribution and regulation by ovarian steroids. *Endocrinology* **134**, 1095–1103.
- Perello, M., Scott, M. M., Sakata, I., Lee, C. E., Chuang, J.-C., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S. A., Elmquist, J. K. y Zigman, J. M.** (2012). Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain. *J. Comp. Neurol.* **520**, 281–294.
- Perogamvros, I., Ray, D. W. y Trainer, P. J.** (2012). Regulation of cortisol bioavailability--effects on hormone measurement and action. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8**, 717–727.
- Perretti, M. y Ahluwalia, A.** (2000). The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids. *Microcirc. N. Y. N* **1994** **7**, 147–161.
- Peters, G., Nüßgen, A., Raabe, A. y Möck, A.** (1991). Social stress induces structural and functional alterations of phagocytes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* **1**, 17–31.
- Petersenn, S., Rasch, A. C., Penschorn, M., Beil, F. U. y Schulte, H. M.** (2001). Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* **142**, 2649–2659.
- Pevet, P.** (1998). Melatonin and biological rhythms. *Thérapie* **53**, 411–420.
- Pevet, P. y Challet, E.** (2011). Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *J. Physiol. Paris* **105**, 170–182.
- Pickering, A. D. y Pottinger, T. G.** (1983). Seasonal and diel changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **49**, 232–239.
- Pickering, A. D. y Pottinger, T. G.** (1987). Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimation. *J. Fish Biol.* **30**, 701–712.
- Pineda-Torra, I., Tsibulsky, V., Delaunay, F., Saladin, R., Laudet, V., Fruchart, J.-C., Kosykh, V. y Staels, B.** (2000). Circadian and glucocorticoid regulation of *Rev-erba* expression in liver. *Endocrinology* **141**, 3799–3806.
- Pittendrigh, C. S.** (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **25**, 159–184.
- Pittendrigh, C. S.** (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 16–54.
- Planey, S. L. y Litwack, G.** (2000). Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 307–312.

- Polakof, S., Ceinos, R. M., Fernández-Durán, B., Míguez, J. M. y Soengas, J. L.** (2007). Daily changes in parameters of energy metabolism in brain of rainbow trout: dependence on feeding. *Comp. Biochem. Physiol. A*. **146**, 265–273.
- Pratt, W. B.** (1997). The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 297–326.
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U. y Schibler, U.** (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* **110**, 251–260.
- Prendergast, B. J.** (2010). MT1 melatonin receptors mediate somatic, behavioral, and reproductive neuroendocrine responses to photoperiod and melatonin in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* **151**, 714–721.
- Prosser, R. A. y Bergeron, H. E.** (2003). Leptin phase-advances the rat suprachiasmatic circadian clock *in vitro*. *Neurosci. Lett.* **336**, 139–142.
- Prunet, P., Sturm, A. y Milla, S.** (2006). Multiple corticosteroid receptors in fish: from old ideas to new concepts. *Gen. Comp. Endocrinol.* **147**, 17–23.
- Qi, X., Reed, J., Englander, E. W., Chandrashekar, V., Bartke, A. y Greeley, G. H.** (2003). Evidence that growth hormone exerts a feedback effect on stomach ghrelin production and secretion. *Exp. Biol. Med.* **228**, 1028–1032.
- Qu, T., Dong, K., Sugioka, K. y Yamadori, T.** (1996). Demonstration of direct input from the retina to the lateral habenular nucleus in the albino rat. *Brain Res.* **709**, 251–258.
- Rafacho, A., Ortsäter, H., Nadal, A. y Quesada, I.** (2014). Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. *J. Endocrinol.* **223**, R49–62.
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. y Menaker, M.** (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247**, 975–978.
- Rance, T. A., Baker, B. I. y Webley, G.** (1982). Variations in plasma cortisol concentrations over a 24-hour period in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **48**, 269–274.
- Rath, M. F., Rohde, K., Fahrenkrug, J. y Møller, M.** (2013). Circadian clock components in the rat neocortex: daily dynamics, localization and regulation. *Brain Struct. Funct.* **218**, 551–562.
- Reddy, A. B., Maywood, E. S., Karp, N. A., King, V. M., Inoue, Y., Gonzalez, F. J., Lilley, K. S., Kyriacou, C. P. y Hastings, M. H.** (2007). Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatol. Baltim. Md* **45**, 1478–1488.
- Redman, J. R. y Armstrong, S. M.** (1988). Reentrainment of rat circadian activity rhythms: effects of melatonin. *J. Pineal Res.* **5**, 203–215.
- Refinetti, R.** (2006). *Circadian Physiology, Second Edition*. CRC Press.
- Reick, M., Garcia, J. A., Dudley, C. y McKnight, S. L.** (2001). NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* **293**, 506–509.
- Reid, S. G., Vijayan, M. M. y Perry, S. F.** (1996). Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary-interrenal axis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Comp. Physiol. B*. **165**, 665–676.



- Reiter, R. J.** (1991). Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol. Cell. Endocrinol.* **79**, C153–158.
- Reppert, S. M. y Weaver, D. R.** (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**, 935–941.
- Reul, J. M. y de Kloet, E. R.** (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* **117**, 2505–2511.
- Reul, J. M. y de Kloet, E. R.** (1986). Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with *in vitro* autoradiography and computerized image analysis. *J. Steroid Biochem.* **24**, 269–272.
- Richards, M. P., Poch, S. M. y McMurtry, J. P.** (2006). Characterization of turkey and chicken ghrelin genes, and regulation of ghrelin and ghrelin receptor mRNA levels in broiler chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* **145**, 298–310.
- Richfield, D. y Häggström, M.** (2014). Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *Wikiversity J. Med.* **1**,
- Riis, A. L. D., Hansen, T. K., Møller, N., Weeke, J. y Jørgensen, J. O. L.** (2003). Hyperthyroidism is associated with suppressed circulating ghrelin levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 853–857.
- Riley, L. G., Hirano, T. y Grau, E. G.** (2002). Rat ghrelin stimulates growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoolog. Sci.* **19**, 797–800.
- Rindi, G., Necchi, V., Savio, A., Torsello, A., Zoli, M., Locatelli, V., Raimondo, F., Cocchi, D. y Solcia, E.** (2002). Characterisation of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues. *Histochem. Cell Biol.* **117**, 511–519.
- Rink, E. y Wullimann, M. F.** (2004). Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res.* **1011**, 206–220.
- Ripperger, J. A. y Albrecht, U.** (2009). Clock-controlled genes. In *Encyclopedia of neuroscience* (ed. Binder, M. D., Hirokawa, N., and Windhorst, U.), pp. 752–757. Springer Berlin Heidelberg.
- Robinson-Rechavi, M., Escriva Garcia, H. y Laudet, V.** (2003). The nuclear receptor superfamily. *J. Cell Sci.* **116**, 585–586.
- Rodríguez-Illamola, A., López Patiño, M. A., Soengas, J. L., Ceinos, R. M. y Míguez, J. M.** (2011). Diurnal rhythms in hypothalamic/pituitary AVT synthesis and secretion in rainbow trout: evidence for a circadian regulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **170**, 541–549.
- Rucinski, M., Ziolkowska, A., Tyczewska, M. y Malendowicz, L. K.** (2009). Expression of prepro-ghrelin and related receptor genes in the rat adrenal gland and evidences that ghrelin exerts a potent stimulating effect on corticosterone secretion by cultured rat adrenocortical cells. *Peptides* **30**, 1448–1455.
- Rüter, J., Kobelt, P., Tebbe, J. J., Avsar, Y., Veh, R., Wang, L., Klapp, B. F., Wiedenmann, B., Taché, Y. y Mönnikes, H.** (2003). Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Brain Res.* **991**, 26–33.
- Saad, M. F., Bernaba, B., Hwu, C.-M., Jinagouda, S., Fahmi, S., Kogosov, E. y Boyadjian, R.** (2002). Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 3997–4000.
- Saini, C., Suter, D. M., Liani, A., Gos, P. y Schibler, U.** (2011). The mammalian circadian timing system: synchronization of peripheral clocks. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **76**, 39–47.

- Saito, D., Shi, Q., Ando, H. y Urano, A. (2004). Attenuation of diurnal rhythms in plasma levels of melatonin and cortisol, and hypothalamic contents of vasotocin and isotocin mRNAs in pre-spawning chum salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* **137**, 62–68.
- Saito, S., Tachibana, T., Choi, Y.-H., Denbow, D. M. y Furuse, M. (2005a). ICV melatonin reduces acute stress responses in neonatal chicks. *Behav. Brain Res.* **165**, 197–203.
- Saito, E.-S., Kaiya, H., Tachibana, T., Tomonaga, S., Denbow, D. M., Kangawa, K. y Furuse, M. (2005b). Inhibitory effect of ghrelin on food intake is mediated by the corticotropin-releasing factor system in neonatal chicks. *Regul. Pept.* **125**, 201–208.
- Sakata, I., Mori, T., Kaiya, H., Yamazaki, M., Kangawa, K., Inoue, K. y Sakai, T. (2004). Localization of ghrelin-producing cells in the stomach of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Zoolog. Sci.* **21**, 757–762.
- Sakata, I. y Sakai, T. (2010). Ghrelin cells in the gastrointestinal tract, ghrelin cells in the gastrointestinal tract. *Int. J. Pept.* **2010**, e945056.
- Sakhi, K., Belle, M. D. C., Gossan, N., Delagrang, P. y Piggins, H. D. (2014). Daily variation in the electrophysiological activity of mouse medial habenula neurones. *J. Physiol.* **592**, 587–603.
- Sánchez, J., Oliver, P., Palou, A. y Picó, C. (2004). The inhibition of gastric ghrelin production by food intake in rats is dependent on the type of macronutrient. *Endocrinology* **145**, 5049–5055.
- Sánchez-Vázquez, F. J., Zamora, S. y Madrid, J. A. (1995). Light-dark and food restriction cycles in sea bass: Effect of conflicting zeitgebers on demand-feeding rhythms. *Physiol. Behav.* **58**, 705–714.
- Sánchez-Vázquez, F. J., Madrid, J. A., Zamora, S., Iigo, M. y Tabata, M. (1996). Demand feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. *Physiol. Behav.* **60**, 665–674.
- Sánchez-Vázquez, F. J., Madrid, J. A., Zamora, S. y Tabata, M. (1997). Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *J. Comp. Physiol. A* **181**, 121–132.
- Sánchez-Vázquez, F. J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J. A. y Tabata, M. (1998). Selection of macronutrients by goldfish operating self-feeders. *Physiol. Behav.* **15**, 211–218.
- Sánchez-Vázquez, F. J. y Madrid, J. A. (2001). Feeding anticipatory activity. In *Food Intake in Fish* (ed. Houlihan, D., Boujard, T., and Jobling, I.) pp. 216–232. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Saper, C. B. y Lowell, B. B. (2014). The hypothalamus. *Curr. Biol.* **24**, R1111–R1116.
- Sasano, H., Fukushima, K., Sasaki, I., Matsuno, S., Nagura, H. y Krozowski, Z. S. (1992). Immunolocalization of mineralocorticoid receptor in human kidney, pancreas, salivary, mammary and sweat glands: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *J. Endocrinol.* **132**, 305–310.
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., Fitzgerald, G. A., Kay, S. A. y Hogenesch, J. B. (2004). A functional genomics strategy reveals *Rora* as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* **43**, 527–537.
- Sato, T., Fukue, Y., Teranishi, H., Yoshida, Y. y Kojima, M. (2005). Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration. *Endocrinology* **146**, 2510–2516.

- Sato, T., Nakamura, Y., Shiimura, Y., Ohgusu, H., Kangawa, K. y Kojima, M. (2012). Structure, regulation and function of ghrelin. *J. Biochem.* **151**, 119–128.
- Satou, M., Nakamura, Y., Ando, H. y Sugimoto, H. (2011). Understanding the functional significance of ghrelin processing and degradation. *Peptides* **32**, 2183–2190.
- Schibler, U., Ripperger, J. y Brown, S. A. (2003). Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J. Biol. Rhythms* **18**, 250–260.
- Schibler, U. (2006). Circadian time keeping: the daily ups and downs of genes, cells, and organisms. *Prog. Brain Res.* **153**, 271–282.
- Schibler, U., Gotic, I., Saini, C., Gos, P., Curie, T., Emmenegger, Y., Sinturel, F., Gosselin, P., Gerber, A., Fleury-Olela, F., et al. (2015). Clock-talk: interactions between central and peripheral circadian oscillators in mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* DOI: 10.1101/sqb.2015.80.027490.
- Schmutz, I., Albrecht, U. y Ripperger, J. A. (2012). The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Mol. Cell. Endocrinol.* **349**, 38–44.
- Schwartz, W. J. y Zimmerman, P. (1991). Lesions of the suprachiasmatic nucleus disrupt circadian locomotor rhythms in the mouse. *Physiol. Behav.* **49**, 1283–1287.
- Seim, I., Amorim, L., Walpole, C., Carter, S., Chopin, L. K. y Herington, A. C. (2010). Ghrelin gene-related peptides: multifunctional endocrine / autocrine modulators in health and disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **37**, 125–131.
- Seoane, L. M., López, M., Tovar, S., Casanueva, F. F., Señarís, R. y Diéguez, C. (2003). Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus. *Endocrinology* **144**, 544–551.
- Sewer, M. B. y Waterman, M. R. (2003). ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc. Res. Tech.* **61**, 300–307.
- Sewer, M. B., Dammer, E. B. y Jagarlapudi, S. (2007). Transcriptional regulation of adrenocortical steroidogenic gene expression. *Drug Metab. Rev.* **39**, 371–388.
- Shepherd, B. S., Johnson, J. K., Silverstein, J. T., Parhar, I. S., Vijayan, M. M., McGuire, A. y Weber, G. M. (2007). Endocrine and orexigenic actions of growth hormone secretagogues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. A.* **146**, 390–399.
- Shibahara, M., Sakurai, T., Nambu, T., Takenouchi, T., Iwaasa, H., Egashira, S. I., Ihara, M. y Goto, K. (1999). Structure, tissue distribution, and pharmacological characterization of *Xenopus* orexins. *Peptides* **20**, 1169–1176.
- Shieh, K.-R., Yang, S.-C., Lu, X.-Y., Akil, H. y Watson, S. J. (2005). Diurnal rhythmic expression of the rhythm-related genes, *rPeriod1*, *rPeriod2*, and *rClock*, in the rat brain. *J. Biomed. Sci.* **12**, 209–217.
- Shiia, T., Nakazato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M. S., Tanaka, M., Nozoe, S.-I., Hosoda, H., Kangawa, K. y Matsukura, S. (2002). Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 240–244.
- Shim, H. S., Kim, H., Lee, J., Son, G. H., Cho, S., Oh, T. H., Kang, S. H., Seen, D. S., Lee, K. H., Kim, K. (2007). Rapid activation of CLOCK by Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase C mediates resetting of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep.* **8**, 366–371.
- Shintani, M., Ogawa, Y., Ebihara, K., Aizawa-Abe, M., Miyanaga, F., Takaya, K., Hayashi, T., Inoue, G., Hosoda, K., Kojima, M., et al. (2001). Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* **50**, 227–232.

- Sidow, A.** (1996). Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 715–722.
- Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P. A. y Lehman, M. N.** (1996). A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* **382**, 810–813.
- Simonneaux, V., Poirel, V.-J., Garidou, M.-L., Nguyen, D., Diaz-Rodriguez, E. y Pévet, P.** (2004). Daily rhythm and regulation of clock gene expression in the rat pineal gland. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **120**, 164–172.
- Sindelar, D. K., Palmiter, R. D., Woods, S. C. y Schwartz, M. W.** (2005). Attenuated feeding responses to circadian and palatability cues in mice lacking neuropeptide Y. *Peptides* **26**, 2597–2602.
- Singletary, K. G., Deviche, P., Strand, C. y Delville, Y.** (2006). Distribution of orexin/hypocretin immunoreactivity in the brain of a male songbird, the house finch, *Carpodacus mexicanus*. *J. Chem. Neuroanat.* **32**, 81–89.
- Singley, J. A. y Chavin, W.** (1975). Serum cortisol in normal goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A* **50**, 77–82.
- Sládek, M., Rybová, M., Jindráková, Z., Zemanová, Z., Polidarová, L., Mrnka, L., O'Neill, J., Pácha, J. y Sumová, A.** (2007). Insight into the circadian clock within rat colonic epithelial cells. *Gastroenterology* **133**, 1240–1249.
- Small, B. C.** (2005). Effect of fasting on nycthemeral concentrations of plasma growth hormone (GH), insulin-like growth factor I (IGF-I), and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **142**, 217–223.
- Small, B. C., Quiniou, S. M. A. y Kaiya, H.** (2009). Sequence, genomic organization and expression of two channel catfish, *Ictalurus punctatus*, ghrelin receptors. *Comp. Biochem. Physiol. A* **154**, 451–464.
- Smoak, K. A. y Cidlowski, J. A.** (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech. Ageing Dev.* **125**, 697–706.
- So, A. Y.-L., Bernal, T. U., Pillsbury, M. L., Yamamoto, K. R. y Feldman, B. J.** (2009). Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 17582–17587.
- Son, G. H., Chung, S. y Kim, K.** (2011). The adrenal peripheral clock: glucocorticoid and the circadian timing system. *Front. Neuroendocrinol.* **32**, 451–465.
- Spencer, R. L., Miller, A. H., Moday, H., Stein, M. y McEwen, B. S.** (1993). Diurnal differences in basal and acute stress levels of type I and type II adrenal steroid receptor activation in neural and immune tissues. *Endocrinology* **133**, 1941–1950.
- Spiga, F., Waite, E. J., Liu, Y., Kershaw, Y. M., Aguilera, G. y Lightman, S. L.** (2011). ACTH-dependent ultradian rhythm of corticosterone secretion. *Endocrinology* **152**, 1448–1457.
- Spiga, F., Walker, J. J., Terry, J. R. y Lightman, S. L.** (2014). HPA Axis-Rhythms. *Compr. Physiol.* **4**, 1273–1298.
- Springer, A. D., Easter, S. S. y Agranoff, B. W.** (1977). The role of the optic tectum in various visually mediated behaviors of goldfish. *Brain Res.* **128**, 393–404.

- Springer, A. D. y Gaffney, J. S.** (1981). Retinal projections in the goldfish: a study using cobaltous-lysine. *J. Comp. Neurol.* **203**, 401–424.
- Springer, A. D. y Mednick, A. S.** (1984). Selective innervation of the goldfish suprachiasmatic nucleus by ventral retinal ganglion cell axons. *Brain Res.* **323**, 293–296.
- Stamenkovic, J. A., Olsson, A. H., Nagorny, C. L., Malmgren, S., Dekker-Nitert, M., Ling, C. y Mulder, H.** (2012). Regulation of core clock genes in human islets. *Metabolism.* **61**, 978–985.
- Stark, R., Reichenbach, A., Lockie, S. H., Pracht, C., Wu, Q., Tups, A. y Andrews, Z. B.** (2015). Acyl ghrelin acts in the brain to control liver function and peripheral glucose homeostasis in male mice. *Endocrinology* **156**, 858–868.
- Stephan, F. K. y Zucker, I.** (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 1583–1586.
- Stephan, F. K.** (2002). The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. *J. Biol. Rhythms* **17**, 284–292.
- Stevanović, D., Milošević, V., Starčević, V. P. y Severs, W. B.** (2007). The effect of centrally administered ghrelin on pituitary ACTH cells and circulating ACTH and corticosterone in rats. *Life Sci.* **80**, 867–872.
- Stevanović, D., Janjetovic, K., Misirkic, M., Vucicevic, L., Sumarac-Dumanovic, M., Micic, D., Starcevic, V. y Trajkovic, V.** (2012). Intracerebroventricular administration of metformin inhibits ghrelin-induced Hypothalamic AMP-kinase signalling and food intake. *Neuroendocrinology* **96**, 24–31.
- Stocco, D. M.** (2000a). StARTing to understand cholesterol transfer. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 445–447.
- Stocco, D. M.** (2000b). Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 184–197.
- Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y. y Menaker, M.** (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* **291**, 490–493.
- Stolte, E. H., de Mazon, A. F., Leon-Koosterziel, K. M., Jesiak, M., Bury, N. R., Sturm, A., Savelkoul, H. F. J., van Kemenade, B. M. y Flik, G.** (2008). Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*. *J. Endocrinol.* **198**, 403–417.
- Storch, K.-F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F. C., Wong, W. H. y Weitz, C. J.** (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* **417**, 78–83.
- Strushkevich, N., MacKenzie, F., Cherkesova, T., Grabovec, I., Usanov, S. y Park, H.-W.** (2011). Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10139–10143.
- Sturm, A., Bury, N., Dengreville, L., Fagart, J., Flouriot, G., Rafestin-Oblin, M. E. y Prunet, P.** (2005). 11-deoxycorticosterone is a potent agonist of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* **146**, 47–55.
- Sujino, M., Furukawa, K., Koinuma, S., Fujioka, A., Nagano, M., Iigo, M. y Shigeyoshi, Y.** (2012). Differential entrainment of peripheral clocks in the rat by glucocorticoid and feeding. *Endocrinology* **153**, 2277–2286.
- Sun, X., Dang, F., Zhang, D., Yuan, Y., Zhang, C., Wu, Y., Wang, Y. y Liu, Y.** (2015). Glucagon-CREB/CRTC2 signaling cascade regulates hepatic BMAL1 protein. *J. Biol. Chem.* **290**, 2189–2197.
- Sutcliffe, J. G. y de Lecea, L.** (2002). The hypocretins: setting the arousal threshold. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 339–349.

- Tahara, Y., Otsuka, M., Fuse, Y., Hirao, A. y Shibata, S. (2011). Refeeding after fasting elicits insulin-dependent regulation of *Per2* and *Rev-erba* with shifts in the liver clock. *J. Biol. Rhythms* **26**, 230–240.
- Tahara, Y. y Shibata, S. (2013). Chronobiology and nutrition. *Neuroscience* **253**, 78–88.
- Takada, M., Tachihara, K., Kon, T., Yamamoto, G., Iguchi, K., Miya, M. y Nishida, M. (2010). Biogeography and evolution of the *Carassius auratus*-complex in East Asia. *BMC Evol. Biol.* **10**, 7–42.
- Takahashi, H., Sakamoto, T., Hyodo, S., Shepherd, B. S., Kaneko, T. y Grau, E. G. (2006). Expression of glucocorticoid receptor in the intestine of a euryhaline teleost, the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Effect of seawater exposure and cortisol treatment. *Life Sci.* **78**, 2329–2335.
- Takaya, K., Ariyasu, H., Kanamoto, N., Iwakura, H., Yoshimoto, A., Harada, M., Mori, K., Komatsu, Y., Usui, T., Shimatsu, A., et al. (2000). Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 4908–4911.
- Tamai, T. K., Carr, A. J. y Whitmore, D. (2005). Zebrafish circadian clocks: cells that see light. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 962–966.
- Tanaka, M., Hayashida, Y., Nakao, N., Nakai, N. y Nakashima, K. (2001). Testis-specific and developmentally induced expression of a ghrelin gene-derived transcript that encodes a novel polypeptide in the mouse. *Biochim. Biophys. Acta* **1522**, 62–65.
- Tao, W., Wu, J., Zhang, Q., Lai, S.-S., Jiang, S., Jiang, C., Xu, Y., Xue, B., Du, J. y Li, C.-J. (2015). EGR1 regulates hepatic clock gene amplitude by activating *Per1* transcription. *Sci. Rep.* **5**, 15212.
- Tasker, J. G., Di, S. y Malcher-Lopes, R. (2006). Rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* **147**, 5549–5556.
- Tavakoli-Nezhad, M. y Schwartz, W. J. (2006). Hamsters running on time: is the lateral habenula a part of the clock? *Chronobiol. Int.* **23**, 217–224.
- Taylor, J. S., Van de Peer, Y., Braasch, I. y Meyer, A. (2001). Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **356**, 1661–1679.
- Teitsma, C. A., Anglade, I., Toutirais, G., Muñoz-cueto, J., Saligaut, D., Ducouret, B. y Kah, O. (1998). Immunohistochemical localization of glucocorticoid receptors in the forebrain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Neurol.* **401**, 395–410.
- Teles, M., Boltaña, S., Reyes-López, F., Santos, M. A., Mackenzie, S. y Tort, L. (2013). Effects of chronic cortisol administration on global expression of GR and the liver transcriptome in *Sparus aurata*. *Mar. Biotechnol. N. Y. N* **15**, 104–114.
- Tena-Sempere, M., Barreiro, M. L., González, L. C., Gaytán, F., Zhang, F.-P., Caminos, J. E., Pinilla, L., Casanueva, F. F., Diéguez, C. y Aguilar, E. (2002). Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* **143**, 717–725.
- Terova, G., Rimoldi, S., Bernardini, G., Gornati, R. y Saroglia, M. (2008). Sea bass ghrelin: Molecular cloning and mRNA quantification during fasting and refeeding. *Gen. Comp. Endocrinol.* **155**, 341–351.

- Thorpe, J. E., McConway, M. G., Miles, M. S. y Muir, J. S.** (1987). Diel and seasonal changes in resting plasma cortisol levels in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **65**, 19–22.
- Thurmond, W., Kloas, W. y Hanke, W.** (1986). Circadian rhythm of interrenal activity in *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**, 260–271.
- Tinoco, A. B., Nisembaum, L. G., de Pedro, N., Delgado, M. J. e Isorna, E.** (2014). Leptin expression is rhythmic in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). Role of feeding time. *Gen. Comp. Endocrinol.* **204**, 239–247.
- Tolle, V., Zizzari, P., Tomasetto, C., Rio, M. C., Epelbaum, J. y Bluet-Pajot, M. T.** (2001). *In vivo* and *in vitro* effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* **73**, 54–61.
- Toshinai, K., Mondal, M. S., Nakazato, M., Date, Y., Murakami, N., Kojima, M., Kangawa, K. y Matsukura, S.** (2001). Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 1220–1225.
- Toshinai, K., Date, Y., Murakami, N., Shimada, M., Mondal, M. S., Shimbara, T., Guan, J.-L., Wang, Q.-P., Funahashi, H., Sakurai, T., et al.** (2003). Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* **144**, 1506–1512.
- Toshinai, K., Yamaguchi, H., Sun, Y., Smith, R. G., Yamanaka, A., Sakurai, T., Date, Y., Mondal, M. S., Shimbara, T., Kawagoe, T., et al.** (2006). Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* **147**, 2306–2314.
- Truscott, B.** (1979). Steroid metabolism in fish. Identification of steroid moieties of hydrolyzable conjugates of cortisol in the bile of trout *Salmo gairdnerii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **38**, 196–206.
- Tsang, A. H., Barclay, J. L. y Oster, H.** (2014). Interactions between endocrine and circadian systems. *J. Mol. Endocrinol.* **52**, R1–16.
- Tschöp, M., Smiley, D. L. y Heiman, M. L.** (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **407**, 908–913.
- Tschöp, M., Statnick, M. A., Suter, T. M. y Heiman, M. L.** (2002). GH-releasing peptide-2 increases fat mass in mice lacking NPY: indication for a crucial mediating role of hypothalamic agouti-related protein. *Endocrinology* **143**, 558–568.
- Ulrich-Lai, Y. M., Arnhold, M. M. y Engeland, W. C.** (2006). Adrenal splanchnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulating adrenal sensitivity to ACTH. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R1128–1135.
- Unniappan, S., Lin, X., Cervini, L., Rivier, J., Kaiya, H., Kangawa, K. y Peter, R. E.** (2002). Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology* **143**, 4143–4146.
- Unniappan, S. y Peter, R. E.** (2004). *In vitro* and *in vivo* effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286**, R1093–1101.
- Unniappan, S., Canosa, L. F. y Peter, R. E.** (2004). Orexigenic actions of ghrelin in goldfish: feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels, and responses to central and peripheral injections. *Neuroendocrinology* **79**, 100–108.

- Unniappan, S. y Peter, R. E. (2005). Structure, distribution and physiological functions of ghrelin in fish. *Comp. Biochem. Physiol. A*. **140**, 396–408.
- Ura, K., Mizuno, S., Okubo, T., Chida, Y., Misaka, N., Adachi, S. y Yamauchi, K. (1997). Immunohistochemical study on changes in gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit during smoltification in the wild masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Fish Physiol. Biochem.* **17**, 397–403.
- Vallone, D., Frigato, E., Vernesi, C., Foà, A., Foulkes, N. S. y Bertolucci, C. (2007). Hypothermia modulates circadian clock gene expression in lizard peripheral tissues. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R160–166.
- van den Top, M., Lee, K., Whymant, A. D., Blanks, A. M. y Spanswick, D. (2004). Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat. Neurosci.* **7**, 493–494.
- van der Lely, A. J., Tschöp, M., Heiman, M. L. y Ghigo, E. (2004). Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr. Rev.* **25**, 426–457.
- van der Veen, D. R., Minh, N. L., Gos, P., Arneric, M., Gerkema, M. P. y Schibler, U. (2006). Impact of behavior on central and peripheral circadian clocks in the common vole *Microtus arvalis*, a mammal with ultradian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3393–3398.
- Vanselow, K. y Kramer, A. (2007). Role of phosphorylation in the mammalian circadian clock. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **72**, 167–176.
- van Thuijl, H., Kola, B. y Korbonits, M. (2008). Appetite and metabolic effects of ghrelin and cannabinoids: involvement of AMP-activated protein kinase. *Vitam. Horm.* **77**, 121–148.
- Vatine, G., Vallone, D., Appelbaum, L., Mracek, P., Ben-Moshe, Z., Lahiri, K., Gothilf, Y. y Foulkes, N. S. (2009). Light directs zebrafish *period2* expression via conserved D and E boxes. *PLoS Biol* **7**, e1000223.
- Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y. y Foulkes, N. S. (2011). It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett.* **585**, 1485–1494.
- Vazzana, M., Vizzini, A., Salerno, G., Di Bella, M. L., Celi, M. y Parrinello, N. (2008). Expression of a glucocorticoid receptor (DlGR1) in several tissues of the teleost fish *Dicentrarchus labrax*. *Tissue Cell* **40**, 89–94.
- Vecino, E., Perez, M. T. y Ekström, P. (1994). *In situ* hybridization of neuropeptide Y (NPY) mRNA in the goldfish brain. *Neuroreport* **6**, 127–131.
- Velarde, E., Haque, R., Iuvone, P. M., Azpeleta, C., Alonso-Gómez, A. L. y Delgado, M. J. (2009). Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of *period* and *cryptochrome* transcripts in retina, liver, and gut. *J. Biol. Rhythms* **24**, 104–113.
- Veo, K., Reinick, C., Liang, L., Moser, E., Angleson, J. K. y Dores, R. M. (2011). Observations on the ligand selectivity of the melanocortin 2 receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* **172**, 3–9.
- Vera, L. M., Davie, A., Taylor, J. F. y Migaud, H. (2010). Differential light intensity and spectral sensitivities of Atlantic salmon, European sea bass and Atlantic cod pineal glands *ex vivo*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **165**, 25–33.
- Vera, L. M., Negrini, P., Zagatti, C., Frigato, E., Sánchez-Vázquez, F. J. y Bertolucci, C. (2013). Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*). *Chronobiol. Int.* **30**, 649–661.



- Vieira, E., Marroquí, L., Batista, T. M., Caballero-Garrido, E., Carneiro, E. M., Boschero, A. C., Nadal, A. y Quesada, I. (2012). The clock gene *Rev-erba* regulates pancreatic  $\beta$ -cell function: modulation by leptin and high-fat diet. *Endocrinology* **153**, 592–601.
- Vijayan, M. M. y Leatherland, J. F. (1990). High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *J. Endocrinol.* **124**, 311–318.
- Vijayan, M. M., Pereira, C., Grau, E. G. e Iwama, G. K. (1997). Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **116**, 89–95.
- Vitari, F., Giancamillo, A. D., Deponti, D., Carollo, V. y Domeneghini, C. (2012). Distribution of ghrelin-producing cells in the gastrointestinal tract of pigs at different ages. *Vet. Res. Commun.* **36**, 71–80.
- Vivas, Y., Azpeleta, C., Feliciano, A., Velarde, E., Isorna, E., Delgado, M. J. y De Pedro, N. (2011). Time-dependent effects of leptin on food intake and locomotor activity in goldfish. *Peptides* **32**, 989–995.
- Volante, M., Fulcheri, E., Allia, E., Cerrato, M., Pucci, A. y Papotti, M. (2002). Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 1013–1021.
- Wada, R., Sakata, I., Kaiya, H., Nakamura, K., Hayashi, Y., Kangawa, K. y Sakai, T. (2003). Existence of ghrelin-immunopositive and -expressing cells in the proventriculus of the hatching and adult chicken. *Regul. Pept.* **111**, 123–128.
- Wada, H. (2008). Glucocorticoids: Mediators of vertebrate ontogenetic transitions. *Gen. Comp. Endocrinol.* **156**, 441–453.
- Wakamatsu, H., Yoshinobu, Y., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M. y Shibata, S. (2001). Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of *mPer1* and *mPer2* mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 1190–1196.
- Walker, J. J., Terry, J. R., Tsaneva-Atanasova, K., Armstrong, S. P., McArdle, C. A. y Lightman, S. L. (2010). Encoding and decoding mechanisms of pulsatile hormone secretion. *J. Neuroendocrinol.* **22**, 1226–1238.
- Wang, L., Saint-Pierre, D. H. y Taché, Y. (2002). Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci. Lett.* **325**, 47–51.
- Wang, H. (2008a). Comparative analysis of teleost fish genomes reveals preservation of different ancient clock duplicates in different fishes. *Mar. Genomics* **1**, 69–78.
- Wang, H. (2008b). Comparative analysis of *period* genes in teleost fish genomes. *J. Mol. Evol.* **67**, 29–40.
- Wang, H. (2009). Comparative genomic analysis of teleost fish *bmal* genes. *Genetica* **136**, 149–161.
- Wang, Y., Nishi, M., Doi, A., Shono, T., Furukawa, Y., Shimada, T., Furuta, H., Sasaki, H. y Nanjo, K. (2010). Ghrelin inhibits insulin secretion through the AMPK-UCP2 pathway in beta cells. *FEBS Lett.* **584**, 1503–1508.
- Wang, Q., Liu, C., Uchida, A., Chuang, J.-C., Walker, A., Liu, T., Osborne-Lawrence, S., Mason, B. L., Mosher, C., Berglund, E. D., et al. (2014). Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin. *Mol. Metab.* **3**, 64–72.

- Warzecha, Z., Dembiński, A., Ceranowicz, P., Dembiński, M., Cieszkowski, J., Konturek, S. J., Polus, A., Pawlik, W. W., Kuwahara, A., Kato, I., et al. (2006). Influence of ghrelin on gastric and duodenal growth and expression of digestive enzymes in young mature rats. *J. Physiol. Pharmacol.* **57**, 425–437.
- Watanabe, N., Itoh, K., Mogi, M., Fujinami, Y., Shimizu, D., Hashimoto, H., Uji, S., Yokoi, H. y Suzuki, T. (2012). Circadian pacemaker in the suprachiasmatic nuclei of teleost fish revealed by rhythmic *period2* expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* **178**, 400–407.
- Weber, E. T. y Rea, M. A. (1997). Neuropeptide Y blocks light-induced phase advances but not delays of the circadian activity rhythm in hamsters. *Neurosci. Lett.* **231**, 159–162.
- Weger, M., Weger, B. D., Diotel, N., Rastegar, S., Hirota, T., Kay, S. A., Strähle, U. y Dickmeis, T. (2013). Real-time *in vivo* monitoring of circadian E-box enhancer activity: a robust and sensitive zebrafish reporter line for developmental, chemical and neural biology of the circadian clock. *Dev. Biol.* **380**, 259–273.
- Welsh, D. K., Yoo, S.-H., Liu, A. C., Takahashi, J. S. y Kay, S. A. (2004). Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr. Biol.* **14**, 2289–2295.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.* **77**, 591–625.
- Westerhof, I., Mol, J. A., Van den Brom, W. E., Lumeij, J. T. y Rijnberk, A. (1994). Diurnal rhythms of plasma corticosterone concentrations in racing pigeons (*Columba livia domestica*) exposed to different light regimens, and the influence of frequent blood sampling. *Avian Dis.* **38**, 428–434.
- Weyts, F. A. A., Cohen, N., Flik, G. y Verburg-van Kemenade, B. M. L. (1999). Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish Shellfish Immunol.* **9**, 1–20.
- Whitmore, D., Foulkes, N. S., Strähle, U. y Sassone-Corsi, P. (1998). Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat. Neurosci.* **1**, 701–707.
- Whitmore, D., Foulkes, N. S. y Sassone-Corsi, P. (2000). Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* **404**, 87–91.
- Wiley, K. E. y Davenport, A. P. (2002). Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br. J. Pharmacol.* **136**, 1146–1152.
- Willesen, M. G., Kristensen, P. y Rømer, J. (1999). Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* **70**, 306–316.
- Wren, A. M., Small, C. J., Ward, H. L., Murphy, K. G., Dakin, C. L., Taheri, S., Kennedy, A. R., Roberts, G. H., Morgan, D. G., Ghatei, M. A., et al. (2000). The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* **141**, 4325–4328.
- Wright, K. P., McHill, A. W., Birks, B. R., Griffin, B. R., Rusterholz, T. y Chinoy, E. D. (2013). Entrainment of the human circadian clock to the natural light-dark cycle. *Curr. Biol.* **23**, 1554–1558.
- Wu, R., Zhou, M., Cui, X., Simms, H. H. y Wang, P. (2003). Ghrelin clearance is reduced at the late stage of polymicrobial sepsis. *Int. J. Mol. Med.* **12**, 777–781.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555–556.

- Xiang, Y., Li, Q., Li, M., Wang, W., Cui, C. y Zhang, J. (2011). Ghrelin inhibits AGEs-induced apoptosis in human endothelial cells involving ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Cell Biochem. Funct.* **29**, 149–55.
- Xu, M. y Volkoff, H. (2007). Molecular characterization of prepro-orexin in Atlantic cod (*Gadus morhua*): cloning, localization, developmental profile and role in food intake regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **271**, 28–37.
- Yabaluri, N. y Bashyam, M. D. (2010). Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J. Biosci.* **35**, 473–484.
- Yabuki, A., Taharaguchi, S., Ichii, O., Kojima, M., Nishi, Y., Mifune, H., Kamimura, R., Matsumoto, M. y Suzuki, S. (2006). Immunohistochemical localization of ghrelin in rodent kidneys. *Histochem. Cell Biol.* **126**, 231–238.
- Yagita, K. y Okamura, H. (2000). Forskolin induces circadian gene expression of *rPer1*, *rPer2* and *dbp* in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett.* **465**, 79–82.
- Yamajuku, D., Inagaki, T., Haruma, T., Okubo, S., Kataoka, Y., Kobayashi, S., Ikegami, K., Laurent, T., Kojima, T., Noutomi, K., et al. (2012). Real-time monitoring in three-dimensional hepatocytes reveals that insulin acts as a synchronizer for liver clock. *Sci. Rep.* **2**, 439–465.
- Yamamoto, T., Nakahata, Y., Tanaka, M., Yoshida, M., Soma, H., Shinohara, K., Yasuda, A., Mamine, T. y Takumi, T. (2005). Acute physical stress elevates mouse *period1* mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J. Biol. Chem.* **280**, 42036–42043.
- Yan, M., Hernandez, M., Xu, R. y Chen, C. (2004). Effect of GHRH and GHRP-2 treatment *in vitro* on GH secretion and levels of GH, pituitary transcription factor-1, GHRH-receptor, GH-secretagogue-receptor and somatostatin receptor mRNAs in ovine pituitary cells. *Eur. J. Endocrinol.* **150**, 235–242.
- Yan, A., Zhang, L., Tang, Z., Zhang, Y., Qin, C., Li, B., Li, W. y Lin, H. (2011). Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) orexin: molecular cloning, tissue expression, ontogeny, daily rhythm and regulation of NPY gene expression. *Peptides* **32**, 1363–1370.
- Yáñez, J., Busch, J., Anadón, R. y Meissl, H. (2009). Pineal projections in the zebrafish (*Danio rerio*): overlap with retinal and cerebellar projections. *Neuroscience* **164**, 1712–1720.
- Yang, J., Brown, M. S., Liang, G., Grishin, N. V. y Goldstein, J. L. (2008). Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* **132**, 387–396.
- Yannielli, P. C., Molyneux, P. C., Harrington, M. E. y Golombek, D. A. (2007). Ghrelin effects on the circadian system of mice. *J. Neurosci.* **27**, 2890–2895.
- Yasuda, T., Masaki, T., Kakuma, T. y Yoshimatsu, H. (2003). Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. *Neurosci. Lett.* **349**, 75–78.
- Yeung, C.-M., Chan, C.-B., Woo, N. Y. S. y Cheng, C. H. K. (2006). Seabream ghrelin: cDNA cloning, genomic organization and promoter studies. *J. Endocrinol.* **189**, 365–379.
- Yin, Y., Li, Y. y Zhang, W. (2014). The Growth Hormone Secretagogue Receptor: Its Intracellular Signaling and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 4837–4855.
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepka, S. M., Hong, H.-K., Oh, W. J., Yoo, O. J., et al. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian

- dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5339–5346.
- Yoshida, K., Kawamura, K. y Imaki, J.** (1993). Differential expression of c-fos mRNA in rat retinal cells: Regulation by light/dark cycle. *Neuron* **10**, 1049–1054.
- Yoshikawa, T., Sellix, M., Pezuk, P. y Menaker, M.** (2009). Timing of the ovarian circadian clock is regulated by gonadotropins. *Endocrinology* **150**, 4338–4347.
- Yoshimoto, A., Mori, K., Sugawara, A., Mukoyama, M., Yahata, K., Suganami, T., Takaya, K., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., et al.** (2002). Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **13**, 2748–2752.
- Yoshimura, K. N. Y.** (2005). Identification of immunoreactive ghrelin and its mrna in the oviduct of laying japanese quail, *Coturnix japonica*. *J. Poult. Sci.* **42**,.
- Zhang, J., Dong, X., Fujimoto, Y. y Okamura, H.** (2004). Molecular signals of mammalian circadian clock. *Kobe J. Med. Sci.* **50**, 101–109.
- Zhao, H. y Rusak, B.** (2005). Circadian firing-rate rhythms and light responses of rat habenular nucleus neurons *in vivo* and *in vitro*. *Neuroscience* **132**, 519–528.
- Zhao, C.-M., Furnes, M. W., Stenström, B., Kulseng, B. y Chen, D.** (2007). Characterization of obestatin- and ghrelin-producing cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rats: an immunohistochemical and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.* **331**, 575–587.
- Zigman, J. M., Jones, J. E., Lee, C. E., Saper, C. B. y Elmquist, J. K.** (2006). Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **494**, 528–548.
- Zvonic, S., Ptitsyn, A. A., Conrad, S. A., Scott, L. K., Floyd, Z. E., Kilroy, G., Wu, X., Goh, B. C., Mynatt, R. L. y Gimble, J. M.** (2006). Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes* **55**, 962–970.